

UNIVERSITAT JAUME I  
Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals  
Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural



UNIVERSITAT  
JAUME·I

**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE LOS CÍTRICOS SOMETIDOS  
A CONDICIONES DE ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO.  
ASPECTOS COMUNES Y ESPECÍFICOS**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Almudena Montoliu Vidal

Dirigida por: Aurelio Gómez Cadenas y Rosa María Pérez Clemente

para optar al grado de:

Doctora Ingeniera Agrónoma



LOS DIRECTORES DE TESIS:

**Dr. Aurelio Gómez Cadenas**, Catedrático del Área de conocimiento de Producción Vegetal del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universitat Jaume I de Castellón.

**Dra. Rosa María Pérez Clemente**, Profesora Contratada Doctora del Área de conocimiento de Producción Vegetal del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universitat Jaume I de Castellón.

HACEN CONSTAR QUE:

La presente memoria de Tesis Doctoral, presentada por Almudena Montoliu Vidal, titulada **“Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico. Aspectos comunes y específicos”** y realizada en el Área de Producción Vegetal de la Universitat Jaume I de Castellón, reúne las condiciones necesarias para su defensa.

**Fdo. Dr. Aurelio Gómez Cadenas**

**Fdo. Dra. Rosa María Pérez Clemente**

Castellón de la Plana, junio del 2010



*A mi familia y amigos*



## Índice de contenidos

Índice de tablas y figuras.....	VI
Abreviaturas y símbolos utilizados.....	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Cultivo de los cítricos.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Taxonomía y origen de los cítricos.....	3
1.1.2. Importancia socioeconómica de la citricultura.....	4
1.1.3. Limitaciones en la producción de los cítricos.....	5
1.1.4. Patrones empleados en la citricultura española.....	5
1.1.5. Cultivo y características de las limas.....	7
1.1.6. Mejora genética de los cítricos.....	8
<b>1.2. Estrés en plantas.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Concepto de estrés en fisiología vegetal.....	9
1.2.2. Tipos de estrés.....	10
1.2.3. Importancia del estudio del estrés en plantas.....	10
1.2.4. Fases de la respuesta de las plantas al estrés.....	11
1.2.5. Mecanismos generales de respuesta al estrés.....	12
<b>1.3. Estrés abiótico en plantas.....</b>	<b>13</b>
1.3.1. Estrés salino.....	14
1.3.2. Mecanismos de tolerancia frente al estrés salino.....	14
1.3.3. Estrés hídrico.....	15
1.3.4. Mecanismos de tolerancia frente al estrés hídrico.....	16

<b>1.4. Estrés biótico en plantas</b> .....	16
1.4.1. Agentes causales del estrés biótico.....	16
1.4.2. Mecanismos de defensa de las plantas contra agentes patógenos.....	17
1.4.3. Patógenos de las plantas: virus.....	18
1.4.4. Clasificación taxonómica de los virus fitopatógenos.....	19
<b>1.5. Estrés abiótico en cítricos</b> .....	20
1.5.1. Influencia del estrés salino en la fisiología de los cítricos.....	20
1.5.2. Influencia del estrés hídrico en la fisiología de los cítricos.....	23
<b>1.6. Estrés biótico en cítricos</b> .....	24
1.6.1. Antecedentes históricos de la tristeza de los cítricos.....	24
1.6.2. Vectores y hospedadores del CTV.....	25
1.6.3. Caracterización y diagnóstico.....	26
1.6.4. Estrategias de control.....	27
<b>1.7. Estrés oxidativo y antioxidantes vegetales</b> .....	28
1.7.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS). Concepto y tipos de ROS.....	28
1.7.2. Efecto nocivo de las ROS.....	30
1.7.3. Estrés oxidativo.....	31
1.7.4. Sistemas antioxidantes en las células vegetales.....	31
1.7.5. Situaciones de estrés y estrés oxidativo.....	33
<b>1.8. Regulación hormonal de la respuesta de las plantas al estrés</b> .....	34
1.8.1. Ácido abscísico (ABA).....	35
1.8.2. Ácido jasmónico (JA).....	36
1.8.3. Ácido salicílico (SA).....	37



<b>1.9. Cultivo <i>in vitro</i> de las plantas superiores</b> .....	38
1.9.1. Fundamentos.....	39
1.9.2. Aplicaciones del cultivo de tejidos <i>in vitro</i> en biotecnología vegetal.....	40
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	43
<b>3. ESTRÉS OSMÓTICO EN CÍTRICOS</b> .....	47
<b>3.1. Introducción</b> .....	47
<b>3.2. Material y métodos</b> .....	49
3.2.1. Material vegetal y medios de cultivo.....	49
3.2.2. Seguimiento del cultivo y recogida de datos.....	51
3.2.3. Análisis estadístico.....	55
<b>3.3. Resultados</b> .....	56
3.3.1. Establecimiento de las condiciones de cultivo idóneas para el estudio del estrés osmótico en CC.....	57
3.3.2. Efecto del estrés osmótico en el crecimiento de las plantas.....	57
3.3.3. Sintomatología en plantas sometidas a estrés osmótico.....	57
3.3.4. Efecto del estrés osmótico en plantas intactas de CC cultivadas <i>in vitro</i> .....	66
3.3.5. Efecto del estrés osmótico en brotes aislados de CC cultivados <i>in vitro</i> .....	76
<b>3.4. Discusión</b> .....	82
<b>4. ESTRÉS SALINO EN CÍTRICOS</b> .....	89
<b>4.1. Introducción</b> .....	89
<b>4.2. Material y métodos</b> .....	91
4.2.1. Material vegetal y medios de cultivo.....	91
4.2.2. Seguimiento del cultivo y recogida de datos.....	93

4.2.3. Análisis estadístico.....	94
<b>4.3. Resultados.....</b>	<b>95</b>
4.3.1. Efecto del estrés salino en plantas de diferentes genotipos de cítricos cultivadas en invernadero.....	95
4.3.2. Efecto de distintas concentraciones de NaCl en plantas de cítricos.....	95
4.3.3. Efecto del estrés salino en los brotes cultivados <i>in vitro</i> de los diferentes genotipos de cítricos.....	98
4.3.4. Efecto del estrés salino a tiempos cortos.....	102
4.3.5. Efecto de los reguladores de crecimiento utilizados en el medio de cultivo.....	102
<b>4.4. Discusión.....</b>	<b>105</b>
<b>5. ESTRÉS BIÓTICO EN CÍTRICOS.....</b>	<b>111</b>
<b>5.1. Introducción.....</b>	<b>111</b>
<b>5.2. Material y métodos.....</b>	<b>115</b>
5.2.1. Material vegetal.....	115
5.2.2. Seguimiento del cultivo y recogida de datos.....	116
5.2.3. Análisis estadístico.....	119
<b>5.3. Resultados.....</b>	<b>120</b>
5.3.1. Daño foliar en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.....	120
5.3.2. Parámetros de fluorescencia de clorofilas.....	123
5.3.3. Parámetros de intercambio gaseoso.....	127
5.3.4. Estrés oxidativo.....	132
5.3.5. Actividad de los enzimas antioxidantes.....	133
5.3.6. Concentración de prolina.....	136

5.3.7. Concentración de fitohormonas.....	137
5.3.8. Metabolómica.....	142
<b>5.4. Discusión.....</b>	<b>149</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>163</b>
<b>8. ANEJOS.....</b>	<b>193</b>

## Índice de tablas y figuras

- Figura 1.1.** Estructura química del ácido abscísico (ABA).
- Figura 1.2.** Estructura química del ácido jasmónico (JA).
- Figura 1.3.** Estructura química del ácido salicílico (SA).
- Figura 3.1.** Imágenes del cultivo *in vitro* de plantas intactas y de brotes aislados de citrange Carrizo.
- Figura 3.3.** Concentración de malondialdehído (MDA) en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*.
- Figura 3.4.** Concentración de prolina en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*.
- Figura 3.5.** Actividad del enzima ascorbato peroxidasa (APX) en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*.
- Figura 3.6.** Actividad del enzima catalasa (CAT) en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*.
- Figura 3.7.** Concentración de ácido abscísico (ABA) en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*.
- Figura 3.8.** Concentración de ácido salicílico (SA) en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*.
- Figura 3.9.** Concentración de ácido jasmónico (JA) en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*.
- Figura 3.10.** Concentración de malondialdehído (MDA) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.
- Figura 3.11.** Concentración de prolina en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.
- Figura 3.12.** Actividad del enzima ascorbato peroxidasa (APX) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.
- Figura 3.13.** Actividad del enzima catalasa (CAT) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.
- Figura 3.14.** Concentración de ácido abscísico (ABA) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.
- Figura 3.15.** Concentración de ácido salicílico (SA) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.
- Figura 3.16.** Concentración de ácido jasmónico (JA) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.
- Figura 4.1.** Contenido de cloruros (Cl) en brotes cultivados *in vitro* de tres genotipos cítricos sometidos a diferentes condiciones de estrés salino.
- Figura 4.2.** Efecto del estrés salino en diferentes genotipos cítricos.
- Figura 4.3.** Evolución de los daños foliares (%) de brotes cultivados *in vitro* de citrange Carrizo, citrumelo CPB 4475 y mandarino Cleopatra sometidos a estrés salino.
- Figura 5.1.** Síntomas foliares en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.
- Figura 5.2.** Fluorescencia variable máxima de clorofilas ( $F_v/F_m$ ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.3.** Rendimiento cuántico del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.4.** Fluorescencia mínima de clorofilas después de adaptación a oscuridad ( $F_0$ ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.5.** Disipación no fotoquímica (NPQ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.6.** Tasa fotosintética neta (A) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.7.** Tasa de transpiración (E) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.8.** Conductancia estomática ( $g_s$ ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.9.** Relación entre la concentración intracelular y la ambiental de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.10.** Concentración de malondialdehído (MDA) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.11.** Actividad del enzima ascorbato peroxidasa (APX) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.12.** Actividad del enzima catalasa (CAT) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.13.** Concentración de prolina en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.14.** Concentración de ácido abscísico (ABA) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.15.** Concentración de ácido salicílico (SA) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.16.** Concentración de ácido jasmónico (JA) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.

**Figura 5.17.** Representación gráfica de los clusters. Brotes de 3-5 hojas

**Figura 5.18.** Representación gráfica de los clusters. Brotes de 6-8 hojas.

**Figura 5.19.** Representación gráfica de los clusters. Brotes de 9-11 hojas

**Figura 5.20.** Representación gráfica de los clusters. Brotes de 12-14 hojas.

**Figura 5.21.** Número de señales significativamente alteradas comunes entre los distintos estadios de desarrollo del brote

**Figura 5.22.** Número de señales significativamente alteradas por la infección de CTV en los diferentes estadios de desarrollo del brote.

**Figure 8.1.** Figure showing *in vitro* cultured shoots of citrange Carrizo.

**Tabla 3.1.** Tiempo de retención y transiciones específicas para cada fitohormona.

**Tabla 3.2.** Efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento en plantas intactas y brotes de citrange Carrizo sometidos a estrés osmótico.

**Tabla 3.3.** Evolución de daños foliares y radiculares en plantas intactas y brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro* sometidos a estrés osmótico.

**Tabla 3.4.** Sintomatología en hojas de plantas de citrange Carrizo sometidas a estrés osmótico.

**Tabla 3.5.** Sintomatología en raíces de plantas de citrange Carrizo sometidas a estrés osmótico.

**Tabla 3.6.** Sintomatología en brotes aislados de citrange Carrizo sometidos a estrés osmótico.

**Tabla 4.1.** Daño foliar, contenido de cloruro (Cl<sup>-</sup>) y malondialdehído (MDA) en hojas de plantas cultivadas en invernadero de tres genotipos de cítricos sometidos a estrés salino.

**Tabla 4.2. Contenido** de cloruros (Cl<sup>-</sup>), malondialdehído (MDA), ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (SA) en brotes de tres genotipos de cítricos sometidos a estrés salino (60 mM NaCl).

**Tabla 4.3.** Contenido de cloruros (Cl<sup>-</sup>), malondialdehído (MDA), ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (SA) en brotes de citrange Carrizo después de 2, 5 y 10 días de tratamiento salino.

**Tabla 4.4.** Daño foliar, contenido de cloruros (Cl<sup>-</sup>) y malondialdehído (MDA) en brotes de citrange Carrizo cultivados en medio suplementado (+) con reguladores de crecimiento o cultivados en medio sin reguladores de crecimiento (-).

## Abreviaturas y símbolos utilizados

A	tasa fotosintética neta
ABA	ácido abscísico
Abs	Absorbancia
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
APX	enzima ascorbato peroxidasa
BAP	6-benzylaminopurina
CC	citrange Carrizo ( <i>Citrus sinensis</i> L. Osb. x <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.)
C <sub>a</sub>	concentración ambiental de CO <sub>2</sub>
CAT	enzima catalasa
C <sub>i</sub>	concentración intercelular de CO <sub>2</sub>
CIT	citrumelo CPB 4475 ( <i>Citrus paradisi</i> L. Macf. x <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.)
CTV	virus de la tristeza de los cítricos ( <i>citrus tristeza virus</i> )
Ddt	días después de tratamiento
DI	decaimiento rápido o tristeza ( <i>decline inducing</i> )
E	tasa de transpiración
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
F <sub>0</sub>	fluorescencia mínima de la clorofila en hojas adaptadas a la oscuridad
F <sub>0</sub>	fluorescencia mínima de la clorofila en hojas adaptadas a la oscuridad
F <sub>M</sub>	fluorescencia máxima de la clorofila en hojas adaptadas a la oscuridad
F' <sub>M</sub>	fluorescencia máxima de la clorofila en hojas adaptadas a la luz
F <sub>s</sub>	fluorescencia mínima de la clorofila en hojas adaptadas a la luz
F <sub>V</sub>	fluorescencia variable de la clorofila en hojas; $F_V = F_M - F_0$
GA <sub>3</sub>	ácido giberélico
GR	enzima glutatión reductasa
g <sub>s</sub>	conductancia estomática
HO <sup>•</sup>	radical hidroxilo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno

HPLC	cromatografía líquida de alta resolución ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
JA	ácido jasmónico
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
MC	mandarino Cleopatra ( <i>Citrus reshni</i> Hort. ex Tan.)
MDA	Malondialdehído
MDHA	Monohidroascorbato
MeJA	metil jasmonato
NADPH	nicotin adenin dinucléotido reducido
NPQ	disipación no fotoquímica ( <i>quenching no fotoquímico</i> )
$O_2^{\bullet-}$	anión superóxido
$^1O_2$	oxígeno singlete
PEG-6000	polietilenglicol-6000
PPFD	densidad de flujo de fotones fotosintéticos
PSII	fotosistema II
RNS	especies reactivas del nitrógeno ( <i>reactive nitrogen species</i> )
rpm	revoluciones por minuto
ROS	especies reactivas del oxígeno ( <i>reactive oxygen species</i> )
SA	ácido salicílico
SAR	resistencia sistémica adquirida ( <i>systemic acquired resistance</i> )
SOD	enzima superóxido dismutasa
TCA	ácido tricloroacético
TBA	ácido tiobarbitúrico
$\Psi$	potencial hídrico
$\Psi_s$	potencial osmótico
$\Psi_t$	potencial de turgencia
$\Psi_m$	potencial matricial
$\Phi_{PSII}$	rendimiento cuántico del PSII



# **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1. CULTIVO DE LOS CÍTRICOS

#### 1.1.1. Taxonomía y origen de los cítricos

Botánicamente, las especies de interés comercial de los cítricos pertenecen a la familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantoideae*, división *Embriophyta Siphonogama*, subdivisión *Angiospermae*, clase *Dicotyledonea*, subclase *Rosidae*, superorden *Rutanae*, orden *Rutales* (Swingle, 1967).

Los seis géneros que constituyen los cítricos verdaderos (*Citrus*, *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Fortunella*, *Microcitrus* y *Poncirus*) se encuentran dentro de la subtribu *Citrinae* y sólo tres de ellos tiene importancia comercial: *Poncirus* (naranja trifoliado), *Fortunella* (Kumquat) y *Citrus* (Moore, 2001). Las especies del género *Citrus* son las más importantes desde un punto de vista agronómico (Agustí, 2003).

Los cítricos son árboles de tamaño y forma variable, según las especies. En las axilas de las hojas presentan espinas de mayor o menor dureza. Las hojas son unifoliadas, las flores (azahar) son muy blancas y los frutos son hesperidios de forma variable. Las semillas, sin endospermo, presentan, en muchas de las especies, dos o más embriones nucelares. Prácticamente todas las especies de *Citrus* son diploides, con  $2n = 18$  cromosomas, y con un genoma relativamente pequeño, 382 Mpb (Arumuganathan y Earle, 1991).

Los agrios tienen su origen en Asia oriental, concretamente en la zona que abarca desde la vertiente meridional del Himalaya hasta China meridional, Indochina, Tailandia, Malasia e Indonesia (Davies y Albrigo, 1994). Hoy en día, su cultivo se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales comprendidas entre los paralelos 44 °N y 41 °S (Agustí, 2003).

El cultivo de los cítricos tiene una tradición muy arraigada en la Comunidad Valenciana. Se tienen referencias bibliográficas muy antiguas, ya Francesc Eiximenis (1340-1409), en el Regiment de la Cosa Pública menciona la existencia de huertos de naranjas y limones. El botánico Cavanilles a finales del siglo XVIII cita la producción de 4,000 tahullas de naranjas de la china que rinden más que otra cosecha (Agustí, 2003).

Las primeras plantaciones comerciales para el consumo en fresco datan de finales del siglo XVIII y se han ido ampliando hasta alcanzar en la actualidad una extensa superficie destinada a su cultivo. Esto ha permitido desarrollar unas técnicas y una cultura específica, basada en la

óptima adaptación de este cultivo al entorno agroclimático y en la calidad de las producciones obtenidas (Zaragoza, 1993).

### **1.1.2. Importancia socioeconómica de la citricultura**

Los cítricos constituyen el cultivo frutal de mayor importancia económica en el mundo. La producción mundial de 2007 fue de aproximadamente 103 millones de toneladas, lo que representa la cuarta parte de toda la producción frutícola (FAO, 2007).

En España, los cítricos son un cultivo frutal de gran importancia socioeconómica; con una producción de más de 5,703,600 toneladas en una superficie de 330,921 ha (MARM, 2009). España es el sexto país productor, por detrás de Brasil, China, Estados Unidos, México e India (FAO, 2007); y el primer país exportador de fruta fresca (MARM, 2009). Otro parámetro que pone de manifiesto la importancia de la citricultura en España es el hecho de que estos 5 primeros países tienen una superficie como mínimo 4 veces superior a la española, por lo que el porcentaje de producción española con respecto a la superficie del país es bastante superior al resto.

En la Comunidad Valenciana, el sector agrario supone el 40 % de las exportaciones en esta actividad a nivel nacional. Entre los principales productos agrícolas, en esta comunidad, destaca el cultivo de cítricos, cuya producción supone más del 60 % de la producción agrícola de la comunidad y el 80 % de la producción cítrica del país (MARM, 2009).

Dentro del conjunto de las especies cítricas cultivadas, existen cuatro grandes grupos productivos: el de las naranjas, el de las mandarinas (donde se incluyen satsumas, clementinas y mandarinas), el de los pomelos, y el de los limones y limas. En España, el grupo más importante es el de las naranjas, constituyendo casi el 52 % de la producción, seguido por el de mandarinas con el 38 % de la producción, el resto (poco más del 10 %) consiste fundamentalmente en limones y, en mucha menor medida, pomelos y limas (MARM, 2009).

Según las estimaciones disponibles de los cultivos cítricos en España para la cosecha de esta campaña 2009/2010 (MARM, 2009), se prevén ligeras disminuciones en naranja (9.5 %), mandarina (8.4 %) y limón (14.2 %). Estas estimaciones ponen de manifiesto que la producción de cítricos en la Comunidad Valenciana está disminuyendo en estos últimos años, aunque continúa siendo un sector de gran importancia económica.

### 1.1.3. Limitaciones en la producción de los cítricos

Los cítricos están sujetos a distintos estreses abióticos, como salinidad y alcalinidad de los suelos, heladas, sequías, altas temperaturas, etc. Además, son susceptibles al ataque de numerosas plagas y enfermedades provocadas por hongos, bacterias, Spiroplasma, fitoplasmas, virus, viroides, y otros agentes patógenos de etiología desconocida.

Algunas enfermedades han tenido gran repercusión en la mayoría de las áreas cítricas, como es el caso de la gomosis producida por el hongo *Phytophthora spp.* (Timmer, 1988) o la tristeza provocada por el virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus Tristeza Virus*, CTV) (Bar-Joseph y cols., 1989). En cambio, existen otras enfermedades restringidas a zonas concretas de la geografía, como el Huanglongbing (antes denominado greening), enfermedad producida por las bacterias *Liberobacter asiaticum* y *L. Africanum* (Garnier y Bové, 1993), que está devastando la citricultura en áreas del sudeste asiático y Sudáfrica.

La aparición de determinadas enfermedades ha obligado a realizar cambios importantes en la citricultura, fundamentalmente la sustitución de los patrones por otros tolerantes a la enfermedad. En el caso de la gomosis, que apareció durante la segunda mitad del siglo XIX (Bou, 1879 citado en Agustí, 2003), y tuvo efectos dramáticos, estuvo a punto de causar la desaparición del cultivo, sólo cuando se sustituyeron los patrones utilizados por naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.), se consiguió controlar la enfermedad (Giner, 1893; Rullán, 1896). La aparición de la tristeza de los cítricos obligó a la utilización de patrones tolerantes, fundamentalmente mandarino Cleopatra, y los citranges Troyer y Carrizo (Forner, 1985), a la vez que se renovaron las técnicas de cultivo (Zaragoza, 1993). Actualmente los citranges son los patrones más utilizados en la citricultura española puesto que además de ser tolerantes al CTV, influyen favorablemente en la calidad de la fruta de la variedad injertada.

### 1.1.4. Patrones empleados en la citricultura española

En la actualidad, los cítricos se cultivan injertando la variedad deseada sobre un patrón (también llamado pie o portainjertos). La respuesta de los árboles depende del comportamiento individual de cada una de las partes, así como de las posibles interacciones injerto/patrón que se puedan producir.

El uso de patrones en el cultivo cítrico, además de por las razones explicadas en el punto anterior, se justifica por el hecho de que confieren otras ventajas, como puede ser (i) una mayor precocidad en la producción, (ii) mayor uniformidad de la plantación, (iii) cierto control sobre la calidad y cantidad de la cosecha para una misma variedad y (iv) adaptación a problemas físico-químicos del suelo (como pueden ser la salinidad, asfixia radicular, sequía).

El patrón aporta el sistema radicular y confiere a la planta resultante una serie de características de tolerancia, vigor y calidad de la fruta. La elección del patrón adecuado es trascendental para obtener el mejor rendimiento posible y una mayor supervivencia ante determinados condicionantes tanto bióticos como abióticos. Hoy en día, podemos encontrar cualquier combinación variedad/patrón en los viveros de cítricos autorizados, aunque existen algunas combinaciones que resultan incompatibles (Forner-Giner, 2002).

A continuación se describen, de forma breve, las principales características agronómicas de algunos de los patrones más utilizados en la citricultura española:

### **Citrango Carrizo**

Se denomina citrangoes, a los híbridos intergenéricos de naranjo dulce y naranjo trifoliado [(*Citrus sinensis* (L.) Osb.) x (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)]. El citrango Carrizo es uno de los primeros patrones tolerantes al CTV que se introdujo en España. Se considera resistente a *Phytophthora spp.* (Álvarez y cols., 2008) a la asfixia radicular (Arbona y cols., 2009a), a elevados porcentajes de caliza activa en el suelo (Pons y cols., 1998) y a nemátodos (Maafi y Damadzadeh, 2008). Los citrangoes son sensibles a la salinidad por lo que no se deben utilizar cuando la concentración de cloruros en el agua de riego se encuentre por encima de los 350 mg L<sup>-1</sup> (Gómez-Cadenas y cols., 2001a).

Tiene buena influencia sobre la variedad injertada, contribuyendo a una rápida entrada en producción y confiere buena calidad a la fruta, adelantando la maduración con respecto a otros patrones, como el naranjo amargo.

No presenta incompatibilidades con la mayoría de las variedades de naranjo injertadas sobre él, mientras que, con algunas variedades de mandarina puede formar miriñaque (Castle y cols., 1993). Por otra parte, la combinación mandarina satsuma y citrango produce plantas que ven reducida su vida considerablemente (Castle y cols., 1993).

### **Mandarino Cleopatra**

Mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) es tolerante a tristeza, exocortis, psoriasis y xiloporosis, también tolera la clorosis férrica y es muy resistente a la salinidad, por lo que se utiliza en zonas con elevados contenidos de cal o problemas de salinidad (Amorós, 2003). Tolerancia suelos con concentraciones de cloruros de hasta 875 mg L<sup>-1</sup> (López-Climent y cols., 2008) y con un contenido en caliza activa del 13 % o con un 40 % de carbonato cálcico total (Agustí, 2003).

El vigor que induce sobre la variedad injertada es menor que otros patrones y aunque se obtiene fruta de mucha calidad, el calibre es menor y la piel más fina. No se ha observado incompatibilidad con ninguna variedad comercial (Castle y cols., 1993).

### **Citrumelo CPB 4475**

Los citrumelos son híbridos interespecíficos de pomelo y naranjo trifoliado [(*Citrus paradisi* (L.) Macf. cv Duncan) x (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)]. El citrumelo CPB 4475, más conocido como citrumelo Swingle, es tolerante a la tristeza, la exocortis, la psoriasis y la xyloporosis, es resistente al ataque de *Phytophthora spp.* y también a los nemátodos (Agustí, 2003). Es menos tolerante a la salinidad (López-Climent y cols., 2008) y a la asfixia radicular (Arbona y cols., 2009a) que los citrangeros. Es muy sensible a la cal activa, que le provoca una fuerte clorosis férrica, por lo que no se debe plantar en tierras con porcentajes de caliza activa superiores al 1 % (Agustí, 2003).

Por lo demás, es un magnífico patrón, con buen vigor y que induce elevada productividad y rápida entrada en producción, así como excelente calidad de frutos, aunque retrasa la maduración. Presenta incompatibilidad con la variedad de limonero Eureka y con diversas variedades de naranjos y mandarinos (Castle y cols., 1993).

#### **1.1.5. Cultivo y características de las limas**

La lima (*Citrus aurantifolia* Swingle) es originaria de Birmania, Malasia y las islas de Indonesia, de este área pasó a la India y desde allí fue llevada a las zonas del Mediterráneo durante la Edad Media (Leal y cols., 1984). Es la especie del género *Citrus* que necesita mayor cantidad de energía calórica para desarrollar y producir frutos de buena calidad (Agustí, 2003), por lo que su cultivo está restringido a zonas de clima templado, requiere una humedad relativa bastante alta y temperaturas elevadas que apenas acusen heladas. Actualmente se cultiva en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, sobre todo en Italia, España, Portugal y Estados Unidos (FAO, 2007).

Las diferentes variedades de lima se reúnen en dos grupos: limas ácidas y limas dulces. Sólo las limas dulces tienen interés comercial (Agustí, 2003). Las limas ácidas se subdividen en dos grupos (Agustí, 2003; Morín, 1967): lima mejicana o Key (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle; limas ácidas pequeñas) y lima Tahití, Persa o Bearss (*Citrus latifolia* L.; limas ácidas grandes).

La lima mejicana recibe también los nombres de limón criollo, limón gallego, limón sutil, limón ceutí, West Indian lime y Key lime. Son árboles muy vigorosos, de pequeño tamaño, con

muchas espinas axilares, cortas y duras. La lima mejicana es muy productiva, de frutos pequeños, redondeados, de corteza lisa y fina, de color amarillo verdoso, con semillas, muy jugosa y ácida.

Se trata de una especie sensible a la salinidad de los suelos, prefiriendo para su correcto desarrollo los suelos pedregosos, poco profundos y con poca materia orgánica. Es una planta muy sensible al CTV (Roistacher, 1991) por lo que se utiliza como indicador biológico para diagnosticar la presencia de este virus, dada la especificidad de reacción, la fácil multiplicación y su crecimiento rápido (Moreno y cols., 2008).

### **1.1.6. Mejora genética de los cítricos**

Algunas de las limitaciones del cultivo de cítricos descritas anteriormente hacen necesario el establecimiento de programas de mejora genética, para obtener nuevos genotipos más resistentes a estreses tanto bióticos como abióticos, y que proporcionen fruta de mayor calidad. Por ello, desde finales del siglo pasado, se han puesto en marcha diversos programas de mejora genética en varios países (Grandbastien, 1998; Soost y Cameron, 1975). Sin embargo, la mejora genética de plantas leñosas, es un proceso muy lento, por lo que es ahora cuando se empiezan a obtener los primeros resultados. A pesar de la gran variabilidad genética de los cítricos y al número de híbridos obtenidos (Herrero y cols., 1996), los resultados de la mejora han sido muy limitados.

- ❖ Respecto a los patrones, tan solo los citranges Troyer y Carrizo, obtenidos en 1909 mediante cruzamiento (Savage y Gardner, 1965) y citrumelo CPB 4475, han sido muy utilizados en algunas áreas citrícolas de España o EEUU. Mientras que una amplia mayoría, son especies de cítricos naturales no mejorados.
- ❖ En cuanto a las variedades, la situación es muy similar, ya que ninguna variedad obtenida a través de la mejora genética convencional ha tenido un uso significativo. La mayoría de las variedades cultivadas proceden de la selección de mutaciones espontáneas, que se producen con relativa frecuencia en los cítricos (Hodgson, 1967).

Los escasos resultados de los programas de mejora tradicional descritos anteriormente, son consecuencia de varios factores relacionados con la biología reproductiva de los cítricos (Rico, 2005):

- ❖ La mayoría de los genotipos son apomícticos, sus semillas producen embriones nucelares que limitan el desarrollo de los embriones zigóticos, dificultando así la



obtención de progenies segregantes de tamaño suficiente para la selección de los caracteres deseados (Papadakis y cols., 2009).

- ❖ Algunos genotipos tienen una esterilidad total o parcial del polen y/o de los óvulos que limita su utilización como parentales en los programas de cruzamiento, además de los frecuentes casos de inter y autoincompatibilidad sexual (Janick, 2004).
- ❖ Los cítricos presentan un largo periodo juvenil y necesitan, en algunos genotipos, hasta ocho años para producir los primeros frutos, lo que implica un retraso excesivo para la evaluación de los caracteres del fruto en la progenie (Frost y Soots, 1968).
- ❖ La mayoría de las especies tienen un elevado nivel de heterocigosis que dificulta la obtención de descendientes con los caracteres deseados (Federici y cols., 1998; Herrero y cols., 1996; Ollitrault y Faure, 1992).
- ❖ Se desconoce el modo de herencia de la mayoría de los caracteres de interés en los cítricos, lo que dificulta la selección de los genotipos más adecuados para los programas de mejora (Bretó y cols., 2001).
- ❖ Solo recientemente, el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido realizar mapas de ligamiento del genoma de cítricos (Rios y cols., 2008; Roose y Williams, 2007; Ruíz y Asins, 2003). Hasta el momento, se han encontrado algunos marcadores moleculares asociados a los caracteres de interés agronómico que podrían ayudar en la selección precoz de la progenie (Deng y Gmitter, 2003).

Las nuevas aproximaciones biotecnológicas, entre las que se encuentran la fusión de protoplastos y la transformación genética, permiten paliar parte de los problemas de la mejora tradicional (Gilchrist y Haughn, 2010; Gimeno y cols., 2009; Papadakis y cols., 2009). Para poder aplicar eficientemente estas técnicas, encaminadas a la obtención de genotipos de cítricos que incorporen los caracteres deseados, es necesario tener un mayor conocimiento sobre aspectos relacionados con la fisiología de este cultivo.

## **1.2. ESTRÉS EN PLANTAS**

### **1.2.1. Concepto de estrés en fisiología vegetal**

El concepto de estrés proviene de la física, es la fuerza que actúa sobre un cuerpo. El cuerpo responde con una reacción proporcional a la fuerza con la que se ha actuado sobre él. La reacción de respuesta es una tensión. En biología el estrés sería un factor externo que afecta negativamente a un organismo. Por lo tanto, la definición biofísica de estrés involucra una

fuerza ejercida sobre un objeto en relación con el área sobre la cual se aplica (es decir, posee un significado equivalente al de presión). Teniendo en cuenta estos conceptos, el término estrés en el marco de la fisiología vegetal refleja la magnitud de presión ambiental que fuerza al cambio en la fisiología de una planta (Nilsen y Orcutt, 1996). Levitt (1980) definió el estrés como: cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para los organismos vivos.

A menudo es difícil distinguir entre aquellas respuestas que repercuten negativamente en la planta y aquellas que poseen un efecto beneficioso. Nilsen y Orcutt (1996) señalan que algunos factores pueden tener ambos efectos simultáneamente. Por ejemplo, la marchitez producida por el déficit hídrico, si bien tiene un efecto negativo en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>, también puede ser positiva para la planta, ya que colabora en la menor absorción de energía lumínica al cambiar el ángulo de exposición, evitando el daño permanente en la hoja por altas temperaturas.

El término estrés utilizado en fisiología vegetal tiene diferentes definiciones. En esta Memoria se tiene en cuenta la que define el estrés como cualquier factor ambiental biótico o abiótico que reduce la tasa de algún proceso fisiológico (por ejemplo, crecimiento o fotosíntesis) por debajo de la tasa máxima que podría alcanzar (Lambers y cols., 1998).

### **1.2.2. Tipos de estrés**

Existen variadas clasificaciones de los factores de estrés. En general, estos pueden ser clasificados como estreses bióticos y estreses abióticos (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Los estreses bióticos son causados por la acción de otros seres vivos: animales, otras plantas (por competencia, alelopatía, etc.), microorganismos (bacterias, hongos), y otros agentes fitopatógenos como los virus y viroides.

Los estreses abióticos, dependiendo del agente causal, pueden dividirse en físicos y químicos. Entre los factores físicos (en realidad, físico-químicos) se pueden mencionar el estrés por déficit o exceso de agua, temperaturas extremas (calor, frío, congelación), salinidad (en su componente osmótico) y radiación UV. Entre los factores químicos destacan la contaminación atmosférica por metales pesados, toxinas, salinidad (en su componente iónico o tóxico) y carencia de elementos minerales.

### **1.2.3. Importancia del estudio del estrés en plantas**

Existen numerosas razones para estudiar la fisiología de las plantas bajo condiciones de estrés, las más importantes, según Tambussi (2004) son: (i) el conocimiento de los factores de estrés en los vegetales puede resultar crucial para la elaboración de modelos mecanísticos de naturaleza predictiva (por ejemplo, el estudio de los posibles efectos del cambio climático); (ii) desde una

perspectiva ecofisiológica, el análisis de la interacción de las plantas con los factores ambientales es fundamental para comprender la distribución de las especies en los diferentes ecosistemas; y (iii) el rendimiento de los cultivos está fuertemente limitado por el impacto de estreses ambientales (Nilsen y Orcutt, 1996).

Por otra parte, es crucial comprender los procesos fisiológicos subyacentes en la tolerancia de los cultivos al estrés a la hora de establecer programas de mejora genética, tanto desde abordajes tradicionales como biotecnológicos (Ali Dib y cols., 1990).

#### **1.2.4. Fases de respuesta de las plantas al estrés**

Los ciclos estrés/respuesta son situaciones que se dan de forma rutinaria a lo largo de la vida de las plantas. El concepto de estrés en sí mismo es relativo, ya que una determinada situación medioambiental puede resultar estresante para una especie y no para otras (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En una escala temporal, la respuesta de las plantas al estrés puede dividirse en tres fases (Lambers y cols., 1998):

- ❖ Fase de alarma: es el efecto inmediato, en general de carácter perjudicial. Ocurre en una escala de segundos a días. Cuando se presenta el estrés, las plantas reaccionan ralentizando o deteniendo sus funciones fisiológicas básicas, reduciendo su vigor. Esta reacción está relacionada con la activación de los mecanismos de los que dispone para hacer frente al estrés. Las plantas que no poseen mecanismos adecuados de defensa o de respuesta frente al estrés experimentan daños irreversibles y mueren. El desenlace es el mismo cuando la situación de estrés es muy intensa y supera la capacidad de respuesta de la planta.
- ❖ Aclimatación (Endurecimiento o Acomodación): es el ajuste morfológico y fisiológico realizado por la planta (como individuo) para compensar el peor funcionamiento de la misma después de la exposición al estrés. Ocurre en una escala de días a semanas. La activación de los mecanismos defensivos o de respuesta conduce a la acomodación del metabolismo celular a las nuevas condiciones, a la activación de los procesos de reparación de la maquinaria celular dañada y a la expresión de las adaptaciones morfológicas.
- ❖ Adaptación: es la respuesta evolutiva que resulta de cambios genéticos en las poblaciones, conduciendo a una compensación morfológica y fisiológica. Ocurre en una escala temporal mucho mayor que la aclimatación, y tras muchas generaciones.

La manifestación de las respuestas de las plantas frente a unas condiciones ambientales adversas implica la puesta en marcha de una secuencia compleja de acciones (Azcón-Bieto y Talón, 2008): en primer lugar se produce la percepción por la planta del estímulo estresante, seguida del procesamiento de la señal de estrés percibida, que implica tanto su amplificación como su integración en la ruta o rutas de transmisión de la información, y finalmente tiene lugar la regulación de la expresión génica.

El estímulo externo de peligro debe transformarse en una señal interna, de naturaleza física o química. Después, esta señal debe transmitirse a través de cascadas o rutas de transmisión de la señal hasta el núcleo de las células, donde se producen los cambios en la expresión génica necesarios para hacer frente al estrés. La percepción del estrés por la planta continúa siendo el aspecto menos conocido de esta secuencia de acciones. Los cambios en la turgencia celular podrían intervenir en el sistema sensor del estrés osmótico, mientras que los elicitores, entre los que se encuentran las proteínas de transferencia de lípidos y cerebrosidos secretados por algunas especies de hongos, activarían la detección por las plantas de los organismos patógenos (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Las condiciones adversas inducen cambios transitorios en los niveles de determinados iones (calcio) y moléculas (lípidos, especies reactivas de oxígeno, especies antioxidantes, óxido nítrico) que advierten a la célula de que ha sido detectada una señal de estrés. Las hormonas realizan una importante función en las rutas de transmisión intracelular de la señal de estrés. El ácido abscísico participa de forma activa en la señalización de muchas de las respuestas al estrés abiótico (Toumi y cols., 2010). Se ha descrito también que otras hormonas, como el etileno, el ácido salicílico y el ácido jasmónico, están implicados en la transmisión de la señal de infección por patógenos (Dempsey y cols., 1999; Dong, 1998; Jameson y Clarke, 2002; Vlot y cols., 2009).

### **1.2.5. Mecanismos generales de respuesta al estrés**

La respuesta al estrés puede ser de muchos tipos, algunos de ellos específicos de un cierto estrés, mientras que otros son más generales (Azcón-Bieto y Talón, 2008):

- ❖ Los cambios en la actividad hormonal. Además de participar en la percepción de la señal, la modificación de los niveles hormonales puede incrementar la resistencia al estrés.
- ❖ Las alteraciones en el desarrollo de las plantas. Normalmente se aprecia un menor desarrollo vegetativo, así como una reducción del número de estructuras reproductivas que aceleran su desarrollo para asegurar la siguiente generación.

- ❖ La muerte celular y la abscisión de los tejidos dañados que elimina el foco de infección en estrés biótico, disminuye la superficie de transpiración y permite reciclar nutrientes.
- ❖ La síntesis de nuevas proteínas, como la ubiquitina y las proteasas implicadas en la degradación de las dañadas, y las proteínas de choque térmico, inducidas no sólo frente a temperaturas extremas, que actúan como chaperonas, plegando proteínas desnaturalizadas por el estrés y previniendo la formación de agregados proteicos irreversibles.
- ❖ El aumento o la disminución en la actividad de rutas alternativas de disipación y obtención de energía, como la fermentativa.
- ❖ La síntesis y acumulación de compuestos osmoprotectores que actúan restaurando el potencial hídrico o bien como protectores de la estructura de membranas y macromoléculas.
- ❖ La síntesis de metabolitos secundarios protectores, como los fenilpropanoides.

### 1.3. ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS

El crecimiento vegetal, así como el desarrollo, el aumento de biomasa y la productividad dependen, en último lugar, de la capacidad del metabolismo y la fisiología vegetal para adaptarse y aclimatarse a las condiciones ambientales en cambio constante.

Las condiciones ambientales son percibidas por los distintos órganos de la planta, y esta información se transmite internamente mediante la modulación de la síntesis de señales, fundamentalmente hormonas, que activan las respuestas de desarrollo y crecimiento vegetativo (Talón y cols., 1991; Zeevaart y cols., 1993). Las respuestas de la planta dependen del genotipo y del estado de desarrollo de la misma en el momento del estrés, de la duración y la severidad del mismo y de los factores ambientales que lo provoquen. Una vez activadas estas respuestas, el crecimiento propiamente dicho, se verá limitado por el aporte de nutrientes, elementos minerales y carbohidratos (Gillapsy y cols., 1993). La planta es capaz de, si las condiciones ambientales se vuelven desfavorables, reprimir las respuestas de crecimiento (incluso después de haberse iniciado el periodo de desarrollo) y desencadenar mecanismos de protección y defensa que abortan el desarrollo y aseguran la supervivencia de la planta bajo condiciones ambientales adversas.

Hay diversas condiciones medioambientales adversas que pueden provocar estrés en la planta (Mano, 2002): la sequía, la salinización del suelo y/o del agua de riego, las temperaturas extremas, el viento fuerte, el encharcamiento del suelo, etc.

### 1.3.1. Estrés salino

La atmósfera provoca la disolución de las sales minerales presentes en las rocas, sedimentos y suelos. Atendiendo al origen de las sales presentes en el sustrato se distinguen dos tipos de salinización. La salinización primaria es aquella derivada de la acumulación de sales de origen mineral en el lecho oceánico, en los suelos salinos, en las aguas subterráneas, etc. (Tanji, 2002). Mientras que la salinización secundaria se produce cuando las sales proceden del agua de riego, de residuos del abonado, de fertilizantes químicos y de la aplicación de lodos de depuradora (Tanji, 2002).

La salinización secundaria se produce directamente por la acción del ser humano. Esta salinización va asociada a la evolución de la agricultura, tanto a nivel de las técnicas de irrigación como a los cambios en el uso y distribución del agua. Se produce debido a una aportación de agua insuficiente que impide una adecuada lixiviación de las sales del suelo (Pitman y Läuchli, 2002). Dentro del área mediterránea este fenómeno es un grave problema que pone en peligro la economía agrícola. La masiva urbanización de las zonas costeras obliga a la sobreexplotación de pozos, lo que provoca un desajuste en el equilibrio de agua dulce-salada y se producen intrusiones marinas que hacen inadecuada el agua para el riego.

El efecto de las sales sobre la fisiología de las plantas presenta una doble vertiente, un efecto osmótico y otro iónico (Munns, 2002). La acumulación de sales en la zona radicular provoca el descenso del potencial hídrico del suelo y dificulta la absorción de agua y nutrientes; pero la planta, a través de diferentes mecanismos, consigue restablecer el balance osmótico. Es en este punto cuando la absorción de las sales y su incorporación a los tejidos llevan a la aparición del efecto iónico que provocará diferentes daños en la planta dependiendo, por una parte de la sensibilidad del genotipo a las sales y, por otra, de la especie iónica implicada (Munns, 2002).

### 1.3.2. Mecanismos de tolerancia frente al estrés salino

Para combatir las condiciones de salinidad, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos y estrategias que se pueden clasificar en (Breckle, 2002):

- ❖ Mecanismos para evitar el estrés salino: (i) crecimiento limitado a las épocas favorables; (ii) elección de los lugares más favorables para el crecimiento y (iii) limitación del crecimiento radical y la absorción en horizontes concretos del suelo.
- ❖ Procesos de evasión y adaptación: (i) absorción selectiva de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ; (ii) compartimentación de las sales en la planta, en determinados tejidos o células: el parénquima xilemático, las raíces o la parte aérea; (iii) síntesis de solutos orgánicos; (iv)

translocación de las sales a las raíces y secreción al exterior; (v) almacenaje en los órganos senescentes y (vi) secreción a través de estructuras similares a glándulas, en la parte aérea.

- ❖ Mecanismos de tolerancia: (i) incremento de la tolerancia de los tejidos, de las células o de los orgánulos celulares y (ii) aumento de la halo-suculencia, mediante el incremento de la suculencia foliar o el aumento de la suculencia del brote y disminución del número de hojas.

Estas estrategias implican la acción de diferentes mecanismos (transporte de solutos compatibles, señalización de procesos en desarrollo, etc.) que intervienen para conseguir que la planta crezca, se desarrolle y llegue a producir en condiciones de elevada salinidad. Las especies vegetales que disponen de esos mecanismos son las especies tolerantes (Breckle, 2002).

Actualmente, en las áreas afectadas por la salinización se usan especies tolerantes y se aplican técnicas de cultivo específicas dirigidas a la reducción de los efectos de la salinidad sobre la producción. Hay muchas estrategias para combatir la salinidad: uso de agua de mayor calidad (menos salada) mientras se asienta el cultivo, uso de patrones tolerantes, etc. La aproximación que ha dado mejores resultados es la implantación de sistemas de riego localizado, que permiten un mejor aprovechamiento del agua (Goyal y cols., 1999; Shennan y cols., 1995).

### 1.3.3. Estrés hídrico

Los principales componentes del potencial hídrico ( $\Psi$ ) son el potencial osmótico ( $\Psi_s$ ), el potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ) y el potencial matricial ( $\Psi_m$ ). El potencial osmótico se debe a la presencia de sustancias disueltas, el potencial de turgencia es el que aparece debido a la presencia de la pared celular y el potencial matricial es el debido a la fuerza de adsorción que ejercen las paredes de los conductos sobre las moléculas de agua circulante. La relación entre el potencial hídrico, potencial osmótico, potencial de turgencia y potencial matricial se expresa como:  $\Psi = \Psi_s + \Psi_t + \Psi_m$ .

Cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés hídrico y pierden agua, su  $\Psi$  disminuye. Esto ocurre normalmente de forma simultánea a una disminución del potencial de turgencia y a una disminución del potencial osmótico, al implicar la pérdida de agua una mayor concentración de solutos. Sin embargo en las plantas que poseen ajuste osmótico, la bajada del  $\Psi$  no implica necesariamente una pérdida de turgencia ya que estas plantas son capaces de acumular de forma activa sustancias osmóticas que disminuyen el  $\Psi_s$ , al menos temporalmente, evitando la pérdida de turgencia y en consecuencia permitiendo el desarrollo normal de la fisiología celular.

Desde el punto de vista agrícola, las posibles soluciones frente al estrés hídrico pasan por la modernización de los sistemas de riego y por la utilización de cultivos con pocas necesidades hídricas. Por ello, numerosos proyectos de investigación a nivel mundial están orientados a la obtención de variedades que sean capaces de resistir mejor las condiciones adversas de falta de agua (Parry y cols., 2005).

### **1.3.4. Mecanismos de tolerancia frente al estrés hídrico**

La resistencia a la sequía de un cultivo hace referencia a su capacidad para crecer satisfactoriamente en zonas con déficit hídrico. Las modificaciones que tienen lugar en la estructura y función de las plantas para aumentar la probabilidad de sobrevivir y reproducirse en un ambiente determinado se llama adaptación.

No todos los mecanismos relacionados con la tolerancia a la sequía están exentos de costes metabólicos para la planta. Turner (1986), estudió la influencia de los mecanismos adaptativos sobre la productividad del cultivo, comprobando que sólo aquellos mecanismos que favorecen el escape a la sequía, el mantenimiento de la entrada de agua y el mantenimiento de la presión de turgencia, no reducen la fotosíntesis, el crecimiento y el rendimiento del cultivo.

Se distinguen tres mecanismos de adaptación de las plantas a la sequía (Blum, 1988; Ceccarelli, 1989):

- ❖ Mecanismos de escape de la sequía: capacidad de las plantas para completar su ciclo de vida antes de que el déficit hídrico sea más severo. En cultivos plurianuales, mediante la selección de precocidad.
- ❖ Mecanismos de aplazamiento o evitación de la deshidratación: capacidad de las plantas para mantener un potencial hídrico relativamente alto en condiciones de estrés hídrico, atmosférico o del suelo, mediante el cierre estomático y el ajuste osmótico.
- ❖ Mecanismos de tolerancia a la deshidratación: (i) capacidad de las plantas para reducir la actividad química del agua; (ii) concentrar solutos y macromoléculas y (iii) producir modificaciones en las membranas celulares.

## **1.4. ESTRÉS BIÓTICO EN PLANTAS**

### **1.4.1. Agentes causales del estrés biótico**

Como se describe en el Apartado 1.2.2 de esta Memoria, el estrés biótico está causado por la acción de otros seres vivos, entre los que cabe destacar:



- ❖ Bacterias, hongos, virus y nemátodos: Para franquear las defensas de los vegetales, algunos patógenos utilizan los estomas u otros órganos de comunicación natural entre la planta y el medio, mientras que otros utilizan presión mecánica o segregan enzimas específicas para romper los tejidos de la planta. Sin embargo, la mayor parte de los patógenos invaden tejidos enfermos o previamente dañados (Fraser, 1987).
- ❖ Plantas: La proximidad espacial se ha considerado tradicionalmente como sinónimo de competencia entre plantas por los recursos limitantes para su desarrollo, que son básicamente la luz, el agua y los nutrientes (Bertness y Callaway, 1994). Las estrategias que utilizan las plantas para asegurarse el acceso a dichos recursos son crecimiento rápido en longitud (competición), la secreción de sustancias tóxicas para otras plantas (alelopatía) o el parasitismo (Weston, 1996).
- ❖ Insectos: Los insectos pueden utilizar a las plantas como alimento. En general, hay dos categorías de insectos herbívoros: (i) insectos chupadores: además de los daños directos que provocan son capaces de transmitir virus depositándolos directamente en el tejido vascular, lo que permite su rápida distribución por la planta y (ii) insectos masticadores: raramente transmiten virus, pero dejan el tejido vegetal dañado y expuesto a ataques de hongos y bacterias necrótrofos.
- ❖ Grandes y pequeños vertebrados: Los efectos que causa el herbivorismo sobre una planta dependen de la magnitud del daño, del momento de desarrollo de la planta y de la propia respuesta de ésta (Charco, 2002). Además del daño causado al tejido de los vegetales, estos animales actúan como vectores de microorganismos.

#### **1.4.2. Mecanismos de defensa de las plantas contra agentes patógenos**

Las plantas están expuestas a un gran número de patógenos, sin embargo, a pesar de ser sésiles y de carecer de un sistema inmune, la muerte de las plantas por enfermedad es una situación excepcional (Whenham y cols., 1986). Ello hace pensar que han desarrollado sistemas de defensa altamente efectivos para detener o contrarrestar la infección. Estos mecanismos son de dos tipos: constitutivos e inducidos por la presencia del patógeno.

Los mecanismos de defensa constitutivos actúan deteniendo la entrada de los patógenos en los tejidos de la planta. Funcionan de forma constante, utilizando estrategias químicas o estructurales. Las primeras consisten en la producción por parte de la planta de gran diversidad de sustancias tóxicas para los organismos patógenos. Ejemplos de éstas son alcaloides, fenoles y polifenoles, aceites esenciales y terpenos en general. Las barreras estructurales consisten en la producción de una cubierta protectora (cutícula) en la superficie de todos los tejidos (Carver y

cols., 1994; Mauch-Mani y Slusarenko, 1996; Mörschbacher y cols., 1990).

Si a pesar de estas barreras el patógeno entra en la planta, ésta puede activar mecanismos de defensa con el fin de detener la infección, son los llamados mecanismos de defensa inducidos por patógeno. Es una reacción más severa a nivel local, en el tejido que está directamente en contacto con el patógeno, y más suave a nivel sistémico, en los tejidos no infectados. Este tipo de reacción permite potenciar las barreras, tanto químicas como estructurales, que los tejidos vegetales tienen de forma constitutiva (Heath, 2000).

### **1.4.3. Patógenos de plantas: virus**

Existe un gran número de virus que infectan plantas. Las enfermedades virales son, después de las enfermedades fúngicas, las fitopatologías con mayor repercusión económica, en las especies cultivadas.

Durante la infección se desencadenan numerosos procesos de interacción entre el virus y la planta. Esta interacción planta-virus es extremadamente compleja. En los últimos años se han esclarecido, aunque sólo parcialmente, los mecanismos asociados con la acumulación y el movimiento viral en la planta, así como las estrategias que ésta utiliza para defenderse de la infección (Gilbertson y Lucas, 1996).

Se establece una interacción compatible entre la planta y el virus (Hammond-Kosack y Jones, 1997) cuando el patógeno logra infectar prácticamente todos los tejidos de la planta. Esto puede ocurrir si las condiciones ambientales son favorables, si las defensas constitutivas de la planta son inadecuadas o la planta no detecta al patógeno, lo que provoca que las respuestas de defensa inducibles sean inefectivas. Por el contrario, si la planta detecta rápidamente la partícula viral, se establece una interacción incompatible y desfavorable para el virus. En estas condiciones, no hay una infección generalizada y se produce el fenómeno de resistencia conocido como respuesta hipersensible que limita la replicación y el movimiento del virus. La respuesta hipersensible o respuesta primaria, es una reacción local y se caracteriza porque provoca una muerte celular programada en el sitio de la infección (Heath, 2000; Shirasu y Shulze-Lefert, 2003). Además, durante el desarrollo de la reacción se producen especies químicas oxidantes (Lamb y Dixon, 1997), se sintetiza callosa y lignina, aumentan los niveles de ácido salicílico (Malamy y cols., 1990) y se producen proteínas relacionadas con la patogénesis (Conejero y Semancik, 1977; Semancik y cols., 1977). La respuesta secundaria es inducida por moléculas señalizadoras y finalmente se desencadena la resistencia sistémica adquirida inducida hormonalmente. Esta última se produce en puntos alejados del punto de entrada del patógeno y previene a la planta de infecciones secundarias (Hutcheson, 1998; Shah, 2009).

Más recientemente se ha descrito un tipo de defensa que aparentemente difiere de la respuesta hipersensible y que consiste en la degradación específica del RNA viral en el citoplasma de la célula infectada mediante lo que se conoce en plantas como silenciamiento génico postranscripcional y que en este caso recibe el nombre de silenciamiento génico inducido por virus (Baulcombe, 2000; Carrington, 2000).

Después de evadir inicialmente los mecanismos de defensa del huésped y conseguir replicarse, el virus ha de moverse a otras partes de la planta (Mahajan y cols., 1996). El movimiento del virus en la planta viene dirigido por una o varias proteínas codificadas en el genoma, conocidas como proteínas de movimiento. A pesar de la ausencia de similitud de secuencia y número de éstas, todas ellas presentan características funcionales comunes (Radhakrishnan y cols., 2008). La mayoría son capaces de unirse a ácidos nucleicos, así como de interactuar con los plasmodesmos celulares y en algunos casos, actuar aumentando el tamaño de exclusión de los mismos (Girish y Usha, 2005). Una característica interesante de estas proteínas es su capacidad para beneficiarse del sistema celular de transporte de macromoléculas para desarrollar su función de movimiento (Gilbertson y Lucas, 1996).

Además de su papel estructural, se han descrito diversas funciones para las proteínas de la cápsida o proteínas de cubierta virales. Están implicadas en muchos de los procesos del ciclo viral, entre los que cabe destacar su participación en: (i) replicación viral (Malik y cols., 2005); (ii) movimiento (Rao y Cooper, 2006); (iii) determinación del hospedador, sintomatología o modo de transmisión (Soto y cols., 2005) y (iv) supresión del silenciamiento génico postranscripcional (Yaegashi y cols., 2007).

En la actualidad, existen varios frentes de investigación abiertos, estrechamente interconectados, entre los que cabe destacar el estudio de los mecanismos que desencadenan el silenciamiento génico postranscripcional, la replicación y el movimiento viral.

#### **1.4.4. Clasificación taxonómica de los virus fitopatógenos**

Según los criterios del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV), los virus de plantas se clasifican en 20 familias y 88 géneros (Fauquet y cols., 2005).

La familia *Closteriviridae* engloba un grupo heterogéneo de virus fitopatógenos con RNA de gran tamaño, cadena sencilla y sentido positivo. Su rango de hospedadores es amplio y son transmitidos de forma semipersistente por insectos pertenecientes a tres familias de homópteros: *Aleyrodidae* (moscas blancas), *Apphidae* (pulgones) y *Coccidae* (cochinillas) (Martelli y cols., 2000). Comprende los siguientes géneros:

- ❖ Género *Closterovirus*. Especie tipo: virus de la amarillez de la remolacha (*Beet yellow virus*, BYV). A este género pertenece el CTV.
- ❖ Género *Crinivirus*. Especie tipo: virus de la amarillez infecciosa de la lechuga (*Lettuce infectious yellows virus*, LIYV).
- ❖ Género *Ampelovirus*. Especie tipo: virus del enrollado de las hojas de vid serotipo 3 (*Grapevine leafroll virus*, GLRaV-3).

En el género *Closterovirus* se incluyen especies virales con un tamaño de partícula que oscila entre 1,200 y 2,000 nm (Matthews, 1991), con genoma de RNA monopartido de 15.5-19.3 Kb, en los que se distinguen dos grupos o bloques de genes altamente conservados, con diferentes estrategias de extensión (Martelli y cols., 2000).

Los miembros de este género están distribuidos mundialmente y su rango de hospedadores es amplio, afectando a especies cultivadas tanto herbáceas como leñosas de interés agrícola y ornamental (Brunt y cols., 1996). Los síntomas que producen en los cultivos herbáceos son amarilleamiento, necrosis nervial y enrollamiento de hojas (Matthews, 1991) y en leñosos amarilleamiento en brotes, incompatibilidad patrón/variedad en plantas infectadas, bronceado, hendidura del tallo, decaimiento y disminución de la calidad de la fruta en postcosecha (Martelli y cols., 2000).

## 1.5. ESTRÉS ABIÓTICO EN CÍTRICOS

En los cítricos, tanto el crecimiento vegetativo como el reproductivo, están claramente limitados por las condiciones ambientales externas, principalmente por el déficit hídrico, la salinidad, la hipoxia o anoxia, las temperaturas bajas y la disponibilidad de nutrientes. En el contexto del trabajo descrito en esta Memoria, se describen a continuación, los efectos que inducen sobre los cultivos de cítricos el estrés salino y el estrés hídrico.

### 1.5.1. Influencia del estrés salino en la fisiología de los cítricos

La salinidad era, hasta hace poco tiempo, una condición adversa de escasa importancia para el cultivo de los cítricos y se localizaba sólo en áreas cercanas a la costa o en determinados ambientes procedentes de la evaporación de aguas cargadas de sales. Sin embargo, el desarrollo experimentado por las técnicas agrícolas en los últimos años, junto a la sobreexplotación de los acuíferos, han provocado que el estrés salino sea, en la actualidad, un problema ampliamente extendido. Se estima que un tercio de la superficie terrestre está afectada, en mayor o menor grado, por un exceso de sales (Pitman y Laüchli, 2002; Tanji, 2002).

Los cítricos son muy sensibles a la salinidad (Storey y Walker, 1999) y en particular a los iones  $\text{Cl}^-$ , que son los responsables de los efectos nocivos de la salinidad en este cultivo, tal como se ha demostrado en trabajos previos (Bañuls y Primo-Millo, 1992; Fergusson y Grattan, 2005; Romero-Aranda y cols., 1998).

Los efectos de los cloruros sobre la fisiología de los cítricos son muy diversos aunque, desde un punto de vista agronómico, se pueden destacar tres: *(i)* reducción en el desarrollo y en la emisión de brotes, que son más escasos y tienden a necrosarse y caer; *(ii)* disminución del volumen de producción así como del número de frutos, aunque la calidad individual de éstos se mantiene prácticamente inalterada y *(iii)* incremento progresivo de la abscisión foliar que, si se produce de forma masiva, puede llegar a provocar la muerte del árbol (Fergusson y Grattan, 2005; Gómez-Cadenas y cols., 1998).

La salinidad provoca dos efectos principales: por un lado el efecto osmótico derivado de la acumulación masiva de sales en el sustrato, con la consecuente bajada del potencial hídrico y por otro el efecto fitotóxico específico de los  $\text{Cl}^-$  (Gómez-Cadenas y cols., 1998).

Los cítricos son capaces de restablecer de forma efectiva el balance osmótico existente entre la planta y el entorno mediante la síntesis de osmolitos compatibles, como la prolina, en la parte aérea y la absorción de iones  $\text{Cl}^-$  procedentes del sustrato (Bañuls y Primo-Millo, 1992; 1995). De esta forma consiguen bajar el potencial hídrico foliar y aseguran el flujo de agua. Este mecanismo encargado de combatir el estrés hídrico generado, tiene efectos negativos a largo plazo, dando lugar a la aparición del efecto fitotóxico, ya que la absorción de iones  $\text{Cl}^-$  y su acumulación en los tejidos puede llegar a niveles tóxicos, y desencadenar toda una serie de respuestas fisiológicas (Bañuls y Primo-Millo, 1992; 1995). La incidencia de este segundo efecto dependerá de la relativa sensibilidad del genotipo considerado (Munns, 2002).

Las respuestas de los cítricos a la salinidad presentan dos fases: una respuesta inicial, relativamente intensa y transitoria, atribuida al componente osmótico y una segunda fase, probablemente solapada con la anterior, que depende en mayor medida de la acumulación de iones tóxicos (Gómez-Cadenas y cols., 1998). La exposición de las plantas a condiciones salinas provoca en primer lugar la inhibición del crecimiento vegetal, como consecuencia del descenso en el potencial hídrico del suelo. Durante este periodo, el estrés originado se debe a la presencia de sal en el exterior de las plantas y no en su interior. En esta primera fase, la reducción del crecimiento parece estar regulada por señales inhibitorias, como la acumulación rápida de hormonas vegetales que se sintetizarían principalmente en la raíz. En estas condiciones, las distintas señales podrían transportarse hasta las hojas, induciendo respuestas generales de adaptación al estrés como son el cierre estomático o la acumulación de osmolitos compatibles.

Debido a la acumulación de iones y solutos compatibles como la prolina, los cítricos son capaces de evitar la pérdida de la turgencia foliar y adaptarse transitoriamente a las nuevas condiciones (Gómez-Cadenas y cols., 2001a). Estas respuestas ralentizan el metabolismo pero permiten a la planta seguir creciendo. Sin embargo, durante la segunda fase, la entrada continua y masiva de iones  $\text{Cl}^-$  provoca la intoxicación y la abscisión foliar en último extremo (Gómez-Cadenas y cols., 1998). La acumulación progresiva de los iones  $\text{Cl}^-$  va acompañada de una reducción en los parámetros de intercambio gaseoso (Bañuls y Primo-Millo, 1995) y, a largo plazo, una disminución progresiva en el contenido de carbohidratos (Arbona y cols., 2005). Gómez-Cadenas y cols. (1998) observaron una relación directa entre la producción de ácido abscísico (ABA), de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y contenido de  $\text{Cl}^-$  en plantas de citrange Carrizo cultivadas en condiciones de estrés salino, lo que sugiere que la acumulación de estos iones en las hojas estimula, mediante un mecanismo en el que podría estar implicado el ABA, la síntesis de ACC y su posterior conversión a etileno que, en último término, es el responsable de la abscisión foliar (Gómez-Cadenas y cols., 1996; Tudela y Primo-Millo, 1992).

Se ha demostrado que, en distintas combinaciones patrón-variedad, la acumulación de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en la parte aérea, está controlada principalmente por el patrón, mientras que, las reducciones en los parámetros de intercambio gaseoso, están controladas por la variedad (Bañuls y cols., 1990; 1996; 1997).

La tolerancia de algunas especies de cítricos al estrés salino se basa en la capacidad de evitar la acumulación masiva de iones  $\text{Cl}^-$  en el entorno celular y, en este aspecto, parecen jugar un papel fundamental diferentes aspectos morfológicos y fisiológicos propios de cada especie (Moya y cols., 1999; 2002; 2003).

La absorción de iones  $\text{Cl}^-$  en cítricos, tiene lugar a través de mecanismos pasivos y su captura está en relación directa con la concentración externa de estos iones (Moya y cols., 1999). La extensión del sistema radical, así como el tamaño de los vasos xilemáticos, son características propias de cada genotipo relacionadas de forma directa con la absorción de iones  $\text{Cl}^-$  (Moya y cols., 1999) que, como se ha demostrado en otros estudios, está ligada a la absorción de agua (Moya y cols., 2003). Otras características fisiológicas, relacionadas con la transpiración y el crecimiento de la masa foliar, están asociadas a la absorción y distribución de estos iones; así, en los genotipos tolerantes, la relación entre la cantidad de  $\text{Cl}^-$  y el volumen de agua absorbida es menor que en los genotipos sensibles (Moya y cols., 2002; 2003). Parte de estas características diferenciales que otorgan mayor tolerancia a la salinidad, pueden transferirse a la variedad que se injerta, lo cual, constituye una gran ventaja cuando el cultivo se desarrolla en condiciones de salinidad (Moya y cols., 2002).

### 1.5.2. Influencia del estrés hídrico en la fisiología de los cítricos

Los factores ambientales que causan en las plantas un déficit hídrico, como la sequía, la salinidad y las temperaturas extremas, son los que más limitan su productividad (Boyer, 2001). La exposición de las plantas a un ambiente con limitaciones de agua durante varios estadios de desarrollo parece activar múltiples cambios fisiológicos y bioquímicos (Araus, 2004). El crecimiento de la planta puede ser inhibido por niveles de estrés moderado que inducen una reducción en el crecimiento y división celular, que son los procesos más sensibles al estrés hídrico, seguidos por la fotosíntesis.

El déficit hídrico tiene lugar en los cítricos como consecuencia de la pérdida de agua de las hojas cuando los estomas se abren para permitir la entrada de CO<sub>2</sub> de la atmósfera que utilizan en la fotosíntesis. La primera respuesta de las plantas durante el estrés por sequía es el cierre de los estomas para evitar las pérdidas por transpiración (Mansfield y Atkinson, 1990). El cierre estomático produce un descenso de la concentración de CO<sub>2</sub> disponible en las hojas y, como consecuencia, un descenso en la tasa fotosintética debido a la disminución de la actividad de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa. Una disminución de los niveles intracelulares de CO<sub>2</sub> da lugar a una sobre-reducción de los componentes de la cadena de transporte electrónico y genera especies reactivas de oxígeno (ROS), como iones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Estos compuestos aunque son tóxicos para la planta y deben ser eliminados, pueden actuar como mensajeros secundarios en la transducción de la señal en la respuesta al estrés hídrico (Arbona y cols., 2008).

En una situación en la que el estrés sea muy intenso y prolongado, la pérdida de agua provoca la marchitez de la planta. A nivel celular esto se traduce en una pérdida de turgencia en el interior de la célula. La falta de agua produce alteraciones en la fluidez y composición de la bicapa lipídica que reducen su capacidad de intercambio con el exterior. El contenido celular se concentra incrementando la posibilidad de interacciones de las proteínas con otras moléculas, lo que provoca su desnaturalización. El incremento de la concentración de solutos puede llegar a niveles tóxicos pudiendo afectar al correcto funcionamiento de algunas enzimas (Hoekstra y cols., 2001).

Otro de los procesos con los que los cítricos hacen frente al déficit hídrico es el ajuste osmótico. En este proceso las plantas disminuyen su potencial osmótico celular mediante la acumulación de solutos en el citoplasma, lo cual ayuda al movimiento de agua hacia el interior de las células aumentando su turgencia. Además, algunos de estos metabolitos también intervienen en la estabilización de proteínas, membranas celulares y macromoléculas evitando la alteración de su estructura y sus funciones o bien, eliminando las moléculas ROS producidas durante el estrés

hídrico.

El estrés hídrico en los cítricos inhibe el crecimiento vegetativo, produciéndose una disminución en la elongación de los brotes, en el desarrollo foliar y en del perímetro del tronco (Ortuno y cols., 2004). En las hojas se produce un cierre de estomas, una curvatura de los bordes hacia el haz y posteriormente una defoliación parcial, además se reduce el potencial osmótico y la conductividad en los estomas (Save y cols., 1995). En condiciones más severas se producen daños y marchitamiento en las hojas. Si tras un periodo de sequía tiene lugar una rehidratación, parte de las hojas sufren abscisión (Gómez-Cadenas y cols., 1996; Tudela y Primo-Millo, 1992) y se produce la floración (Krajewski y Rabe, 1995). La aparición del estrés durante los estados fenológicos de floración, cuajado y desarrollo del fruto, provoca una fuerte reducción en el número de frutos debido a una fuerte caída de los mismos. El déficit hídrico puede llegar a inhibir la fotosíntesis, reduciendo el aporte de carbohidratos al fruto y deteniendo de ese modo su crecimiento (Blanke y Bower, 1991). La calidad del fruto también puede verse afectada puesto que la acidez y el contenido de azúcares aumentan y disminuye el contenido de zumo (Hockema y Etxeberria, 2001). Además, se reduce la consistencia y la turgencia de la corteza, haciéndose más vulnerable a factores externos.

## **1.6. ESTRÉS BIÓTICO EN CÍTRICOS**

### **1.6.1. Antecedentes históricos de la tristeza de los cítricos**

Entre las enfermedades de los cítricos transmisibles por injerto, la tristeza ha sido considerada como la más importante y devastadora a escala mundial (Bar-Joseph y cols., 1989; Cambra y Moreno, 2000), tanto por los daños económicos que ha causado como por los cambios que ha obligado a introducir en los sistemas de cultivo en las zonas afectadas.

Es muy posible que la tristeza sea originaria de Asia como los cítricos y, desde ahí, se haya dispersado prácticamente a la totalidad de las zonas citrícolas del mundo a través del intercambio de material de propagación infectado (Cambra y cols., 1990b) y una vez instalada en el campo, hayan sido los áfidos presentes los encargados de difundirla a corta distancia (Cambra, 1994). Probablemente en el siglo XVII se extendió a Sudáfrica, luego a Australia, al área de Sydney en la segunda mitad del siglo XIX, y posteriormente en el siglo XX a América (Broadbent y cols., 1996; Cambra y Moreno, 2000). La enfermedad apareció en Argentina en 1930, Brasil en 1937, California (EEUU) en 1939, Florida (EEUU) en 1951, España en 1957, Israel en 1970 y Venezuela en 1980 (Bar-Joseph y cols., 1989; Cambra y Moreno, 2000; Cambra y cols., 1991).



Las pérdidas económicas que ha causado esta enfermedad son muy elevadas. Se estima que más de 80 millones de árboles de naranjo dulce, pomelo y mandarino injertados sobre naranjo amargo han muerto desde 1930 por tristeza en todo el mundo (Román y cols., 2004).

En España, la enfermedad se manifestó de forma epidémica en 1957 y, desde entonces se estima que ha causado la muerte de más de 40 millones de árboles de naranjo dulce y mandarinos injertados sobre naranjo amargo (Cambra y cols., 2000a). Al igual que en otros países, la enfermedad se difundió con rapidez, principalmente debido a cuatro causas (Agustí, 2003): (i) la existencia de focos iniciales repartidos por diferentes comarcas, (ii) la actividad de los pulgones sobre el nuevo material que brotaba tras las heladas, (iii) el cambio varietal por sobreinjerto con material infectado, o bien (iv) por el uso masivo de naranjo amargo, patrón altamente sensible al CTV.

La muerte de los árboles injertados sobre naranjo amargo, como consecuencia de la tristeza, ha hecho necesario modificar los sistemas de producción en todos los países citrícolas en donde la enfermedad está presente, ocasionando dos tipos de perjuicios indirectos. Por una parte, la utilización de otros patrones ha dado lugar a problemas de tipo agronómico, puesto que ninguno de los nuevos patrones tiene la rusticidad del naranjo amargo. Por otra parte, muchos de los patrones utilizados en la actualidad son sensibles a enfermedades transmisibles por injerto, como las causadas por los viroides, a los que el naranjo amargo es tolerante (Durán-Vila y cols., 1988).

### **1.6.2. Vectores y hospedadores del CTV**

El virus de la tristeza puede ser transmitido desde plantas enfermas a plantas sanas mediante injerto con material infectado y a través de pulgones vectores del virus de forma semipersistente (Garnsey y Müller, 1986). Este virus no se transmite por semilla (Roistacher, 1991). En el proceso de transmisión del virus, influyen diversos factores: la especie del áfido y su estadio, el número de insectos, la raza del virus, cuál sea la planta donante y la aceptora, la temperatura, la irrigación, la ocurrencia de lluvias repentinas, la fertilización, así como el tiempo de adquisición e inoculación del virus (Naranjo, 1997a).

En España, las principales especies de áfidos vectores del virus son: *Toxoptera aurantii*, *Aphis citricida* y *Aphis gossypii*, siendo este último el vector más eficiente (Cambra y cols., 1988, 1990a; Gottwald y cols., 1996). No obstante, debe transcurrir mucho tiempo entre la introducción de una fuente primaria de inóculo y el posterior desarrollo epidémico de la enfermedad (Garnsey y Lee, 1988).

La gama de hospedadores del virus de la tristeza está prácticamente restringida a la familia *Rutaceae* y en particular a las especies e híbridos de los géneros *Citrus* y *Fortunella*. Se han hecho diversas clasificaciones con respecto a la susceptibilidad o tolerancia de las especies cítricas al CTV. Carrero (1981) y Navarro (1981), citados por Naranjo (1997a), establecieron la siguiente clasificación, según el comportamiento de los diferentes genotipos ante el CTV:

- ❖ Genotipos hipersensibles: naranjo amargo, limoneros y algunas variedades de pomelos.
- ❖ Genotipos muy sensibles: lima mejicana, lima dulce de Palestina, cidro Etrog, *Citrus hystrix*, *C. excelsa*, *C. macrophylla* y citrange Uvalde.
- ❖ Genotipos sensibles: pomelos, kumkuat, algunos tangores como la variedad ‘Temple’, naranjos dulces como los cultivares ‘Pera’, ‘Mediterraneo’, ‘Hassaku’ y también los citranges Savage, Morton y Rusk.
- ❖ Genotipos moderadamente tolerantes: los restantes naranjos dulces, lima Rangpur, citrange Troyer, naranjo trifoliado y limón Rugoso.

Por otra parte, el virus también se transmite entre algunas especies de géneros afines a *Citrus* como: *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Fortunella*, *Hesperthusia*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium*, *Severinia* y *Swinglea* (Cambra y Moreno, 2000; Yoshida, 1996).

### 1.6.3. Caracterización y diagnóstico

Como se ha indicado en el Apartado 1.4.4 de esta Memoria, el CTV pertenece a la familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus* (Karasev y cols., 1995). Su genoma está constituido por RNA de cadena simple y polaridad positiva con 12 marcos abiertos de lectura (*Open reading frame*) y 2 regiones no traducidas (*Unstranlated region*), con capacidad para codificar al menos 17 proteínas (Karasev, 2000; Karasev y cols., 1995). Este RNA está protegido por una cápsida formada por dos proteínas de 25 y 27 Kda aproximadamente (Cambra y Moreno, 2000; Moreno y cols., 2007). Existe un gran número de aislados de CTV que difieren en sus características biológicas, serológicas, perfil de RNAs bicatenarios o secuencia de RNA genómico (Cambra y Moreno, 2000).

En cítricos, la presencia de CTV está limitada a las células asociadas del floema. Como consecuencia de la acumulación de mutaciones y recombinaciones homólogas pueden coexistir diferentes aislados en las plantas infectadas (Manjunath y cols., 2000). Se ha secuenciado el genoma de diferentes aislados de CTV, entre los que se encuentra un aislado suave, el T385 (Vives y cols., 1999) y un aislado severo, el T318 (Ruíz-Ruíz y cols., 2006) ambos presentes en

España.

El diagnóstico de CTV por métodos biológicos en invernadero o en el laboratorio es necesario dado que existen aislados que inducen síntomas muy variables en las distintas especies y combinaciones patrón/variedad. El procedimiento clásico de detección del virus es la inoculación mediante injerto de material sospechoso en lima mejicana (Wallace y Drake, 1951). La observación de los síntomas: aclaramiento de las nerviaduras, acucharamiento de las hojas y acanaladuras en la madera, puede tener lugar tras un período de cultivo que varía de 4 a 6 meses en condiciones controladas de invernadero, con temperaturas diurnas entre 24 a 28 °C y 17-21 °C durante la noche (Roistacher, 1991). El inconveniente de esta prueba es la lentitud en el diagnóstico, su elevado coste y la imposibilidad de ser usada de forma masiva (Cambra, 1983).

Actualmente se utiliza la técnica inmunoenzimática ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) puesta a punto por Bar-Joseph y cols. (1979) y Cambra y cols. (1979; 2000b), que permite un diagnóstico rápido (24 horas) con alta sensibilidad y bajo coste. Es el método recomendado por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (2004), tras su validación en comparación con otras técnicas de detección de CTV (Cambra y cols., 2002). Se suelen aplicar anticuerpos monoclonales desarrollados para el CTV que reaccionan con la mayoría de los aislados conocidos (Cambra y cols., 1990b; 2000a; b).

#### **1.6.4. Estrategias de control**

Considerando la naturaleza viral de la enfermedad de la tristeza, los países productores de cítricos deben adoptar diversas medidas o estrategias de control, para evitar pérdidas en las plantaciones comerciales (Navarro, 1984). Las medidas para paliar los daños causados por la tristeza dependen de la incidencia del virus en un momento dado, de los vectores presentes, del tipo de aislado y de las variedades cultivadas en cada zona. Los métodos de lucha pueden ser directos (tratan de impedir la entrada en una zona libre de virus o bien eliminar la enfermedad si ya está presente) o indirectos (tratan de evitar o reducir los daños causados por la enfermedad).

En una zona cítrica donde no se encuentra presente el CTV, una estrategia importante es el empleo de barreras fitosanitarias que impidan el ingreso de material vegetal infectado. Para ello los países poseen medidas reguladoras y de cuarentena que impiden o regulan la introducción de material vegetal a una región dada. Cuando en un país o región cítrica se ha detectado la presencia de aislados de CTV, con niveles bajos de infección (inferiores al 1 %), es posible tomar medidas de erradicación, es decir, llevar a cabo una prospección y eliminar los árboles infectados, con el propósito de retardar la aparición de la enfermedad o disminuir su inóculo.

Una de las formas más eficaces de impedir la dispersión de enfermedades transmisibles por injerto, es la exclusiva propagación de material certificado, con garantías sanitarias y varietales (Gómez y cols., 2009). En España, a partir de 1968 y como consecuencia de los graves daños en las plantaciones y la amenaza de un grave desastre socioeconómico causado por el CTV, se adoptaron diversas medidas legales relacionadas con la producción de plántones de cítricos. Se establecieron medidas de cuarentena y control de la introducción de nuevas variedades y patrones, y se puso en marcha un programa de obtención de plantas certificadas libres de virus e injertadas sobre patrones tolerantes a la enfermedad (Cambra y cols., 2000a; Navarro y cols., 2003). El desarrollo de la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* permitió iniciar en 1975 el Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Cítricos, programa que es la combinación de tres programas coordinados: Cuarentena, Saneamiento y Certificación.

En algunas áreas cítricas, el uso de patrones tolerantes resulta insuficiente para evitar los daños ocasionados por el CTV debido a la presencia de aislados más virulentos que causan daños en algunas variedades comerciales independientemente del patrón utilizado. En estos casos la utilización de la protección cruzada o preinmunización puede controlar los daños causados por la enfermedad. Esta técnica consiste en proteger a una planta de los daños provocados por un aislado muy virulento preinoculándola con un aislado poco virulento (Costa y Müller, 1980; Van Vuuren y cols., 1993). Esta medida es sólo aplicable en zonas donde la tristeza es endémica y existen aislados virulentos, ya que existe el riesgo de que el aislado no virulento preinoculado en una variedad se vuelva virulento en la misma o en otras variedades (Fulton, 1986).

El método de control más eficaz de los virus es la utilización de resistencia genética frente a éstos. Puesto que la tristeza, en muchos casos, es una enfermedad que afecta a la combinación patrón/variedad, lo ideal sería obtener combinaciones resistentes utilizando genes de resistencia distintos, para procurar la máxima durabilidad. A pesar de que se han descrito algunos genes de resistencia (Fang y cols., 1998; Mestre y cols., 1997) los programas de mejora clásica para obtener genotipos resistentes al CTV no han dado los resultados esperados. Las aproximaciones biotecnológicas, como la obtención de plantas transgénicas resistentes a CTV constituyen una de las vías más prometedoras para el control de la enfermedad (Domínguez y cols., 2000; Fagoaga y cols., 2006; Ghorbel y cols., 2000).

## **1.7. ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES VEGETALES**

### **1.7.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS). Concepto y tipos de ROS**

El funcionamiento de las cadenas de transporte electrónico puede sufrir alteraciones como consecuencia de las condiciones ambientales o del estado de desarrollo, originándose especies oxidantes y/o reductoras, denominadas especies reactivas de oxígeno.

Las ROS son formas parcialmente reducidas del oxígeno (Sies, 1991). Su formación es un proceso normal, inevitable y constante en organismos que poseen un metabolismo energético basado en reacciones de oxidación-reducción (Mano, 2002) ya que son producto de multitud de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. No obstante, son especies químicas altamente reactivas y con poder oxidante que, dependiendo de la especie, pueden dañar diversos componentes celulares tales como lípidos (Moran y cols., 1994; Munné-Bosch y Alegre, 2002), proteínas (Berlett y Stadtman, 1997) y ácidos nucleicos (Sies, 1993a).

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas ROS, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Halliwell, 1999; Slater, 1984). Por lo tanto, cuando se produce un desequilibrio entre el balance ROS y las defensas antioxidantes es cuando tiene lugar el daño en los tejidos y estrés oxidativo (Sies, 1993b).

Existen numerosas ROS, entre ellas podemos encontrar radicales libres, como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) (Edreva, 2005). Por otro lado, entre las formas no radicales encontramos el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Briviba y cols., 1997). El anión superóxido también puede reaccionar con radicales como el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) generando peroxinitrito ( $OONO^{\cdot}$ ), precursor de otros potentes agentes oxidantes que reciben el nombre de especies reactivas del nitrógeno (Beckman, 1996). Por este motivo, la generación de ROS va inevitablemente unida a la producción de especies reactivas del nitrógeno.

El radical superóxido es el producto del oxígeno molecular  $O_2$ . Existe en equilibrio con el radical hidroperoxil ( $HO_2^{\cdot}$ ). Se suele producir en situaciones en las que hay un transporte electrónico asociado a membranas (cadena de transporte mitocondrial o transporte electrónico en el aparato fotosintético).

El peróxido de hidrógeno se produce a partir de la reducción del anión radical, en un proceso denominado dismutación. También se puede producir a partir de la fotorespiración, iniciada por la actividad oxigenasa de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa en el estroma del cloroplasto, y la posterior producción de  $H_2O_2$  en los peroxisomas.

El radical hidroxilo se forma a partir de la reacción catalizada por metales pesados de transición (principalmente  $Fe^{+2}$  y  $Cu^{+2}$ ) en los compartimentos celulares donde coexisten  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ . La reacción de Haber-Weiss consiste en la reducción de  $H_2O_2$  a partir de un electrón cedido por el metal de transición.

El oxígeno singlete se produce a partir de la desexcitación de las clorofilas en los centros de reacción cuando se produce la cesión de un electrón en estado de singlete al oxígeno molecular. Es una molécula nucleofílica que reacciona con moléculas orgánicas.

### 1.7.2. Efecto nocivo de las ROS

De forma general, los efectos que provocan las ROS son: (i) la inhibición de enzimas susceptibles de reaccionar con ellas. Su reacción con proteínas puede modificar determinados aminoácidos y romper las cadenas polipeptídicas o modificar lugares de señalización para proteólisis, etc., (ii) la reacción con los pigmentos tipo clorofila produciendo su degradación, (iii) la peroxidación de lípidos: los radicales libres y también el  $\text{H}_2\text{O}_2$  reaccionan con los ácidos grasos insaturados produciendo hidroperóxidos de lípidos. La presencia, en estas condiciones, de iones metálicos, conduce a la producción de radicales alcoxil y peroxil que actúan en una reacción en cadena propagando esta reacción por todas las membranas celulares, alterando de forma drástica la estructura y funcionalidad celular y (iv) la fragmentación del DNA producida por la reacción de los radicales hidroxil con las bases nitrogenadas, que es un efecto de las ROS muy difícil de reparar (Mano, 2002).

La más reactiva de estas ROS es el radical  $\text{HO}^\bullet$ , un poderoso oxidante que, aunque de difusión celular limitada, puede dañar la mayoría de los compuestos orgánicos (Czapski, 1984). El efecto más nocivo del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  es el de inactivar ciertos enzimas con centros de hierro-sulfuro debido a su tolerancia a ser electrostáticamente atraído al átomo de hierro de estos centros catalíticos (Flint y cols., 1993). El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aunque es menos reactivo que el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y el  $\text{HO}^\bullet$  puede, debido a su elevada capacidad de difusión, reaccionar con gran cantidad de biomoléculas e inactivar su función. Puede oxidar las cadenas laterales de los aminoácidos e inducir la introducción de grupos carbonilo (Stadtman y Levine, 2003) y, al igual que el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , puede oxidar directamente enzimas con grupos hierro-sulfuro (Flint y cols., 1993). Generalmente, estas modificaciones conllevan una alteración en la estructura de la proteína que conduce a la pérdida de función o actividad; sin embargo, también se han descrito modificaciones reversibles inducidas por  $\text{H}_2\text{O}_2$  que no suponen pérdida de función: la oxidación de metionina a metionina sulfóxido y ciertos estados de oxidación de residuos de cisteína (Garner y cols., 1998; Sigalov y Stern, 1998). El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , puede oxidar de forma irreversible el grupo tiol de los residuos de cisteína generándose estados altos de oxidación tanto sulfínicos ( $\text{R-SO}_2\text{H}$ ) como sulfónicos ( $\text{R-SO}_3\text{H}$ ) que producen la inactivación de la proteína (Cohen y cols., 2003); sin embargo, esta oxidación también puede ser reversible por la formación de grupos sulfénicos ( $\text{R-SOH}$ ) que pueden reducirse de nuevo al grupo tiol o bien reaccionar con otras cisteínas cercanas y formar puentes disulfuro intra o intermoleculares. Esta reversibilidad en la oxidación permite modular actividades enzimáticas o regular la actividad de proteínas que actúan como sensores de ROS.

### **1.7.3. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986). Es un estrés de tipo bioquímico, derivado de la propia acción del metabolismo (Mano, 2002). Cualquier alteración de las condiciones óptimas de cultivo incide de forma negativa en la fisiología de la planta, se altera la cadena de transporte electrónico y se genera un estrés oxidativo (Halliwell, 1987).

Esta alteración bioquímica se manifiesta como un incremento en la tasa de producción de ROS que puede conducir a la destrucción de los sistemas celulares. Por lo tanto, el incremento en la capacidad de eliminación de estas ROS por parte de la planta se considera como síntoma de tolerancia, mientras que la ausencia de respuesta o una disminución respecto de los valores control se considera síntoma de sensibilidad (Hernández y cols., 1995; 2000). El mantenimiento de las ROS a un nivel compatible con el funcionamiento celular normal se lleva a cabo por diversas actividades enzimáticas en combinación con otras moléculas de carácter no proteico con capacidad antioxidante. Asimismo, frente a situaciones de estrés oxidativo, las células dirigen su funcionamiento hacia la detención de su crecimiento, la apoptosis o la necrosis.

Existen diversos marcadores que indican el grado de daño oxidativo que están sufriendo las plantas, entre ellos está el malondialdehído (MDA) que es un subproducto de la peroxidación de lípidos en las membranas biológicas (Wong y cols., 1987). El aumento en el contenido de esta molécula es indicativo de un incremento del daño oxidativo (Arbona y cols., 2003; 2008; Hossain y cols., 2009).

Los ácidos grasos insaturados pueden sufrir peroxidación en presencia de ROS, afectando a la estructura y función de las membranas celulares. Las principales consecuencias son la descompartimentación de iones, la pérdida del potencial de membrana, la inhibición del transporte de metabolitos y la modificación de los receptores de hormonas, produciéndose finalmente la muerte celular. La peroxidación de algunos ácidos grasos poliinsaturados produce la formación de mensajeros químicos como el ácido jasmónico, el ácido metil-jasmónico y otras oxilipinas implicados en la respuesta defensiva frente a las ROS (Moller y cols., 2007; Wasternack, 2007).

### **1.7.4. Sistemas antioxidantes en las células vegetales**

Se puede definir antioxidante como cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparadas con la del sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato (Halliwell y cols., 1995).

Las ROS producidas en las células son eliminadas por diversos sistemas antioxidantes que se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos, aunque en muchos casos ambos tipos de antioxidantes funcionan en forma coordinada (Foyer y cols., 1994; Perl-Treves y Perl, 2002).

- ❖ Antioxidantes enzimáticos: en este grupo se encuentran diversos enzimas tales como catalasa (CAT) que elimina  $H_2O_2$  en los peroxisomas, superóxido dismutasa (SOD) que elimina el anión-radical superóxido, ascorbato peroxidasa (APX) que elimina  $H_2O_2$  en diversos compartimentos y glutatión reductasa (GR) encargada de la regeneración del glutatión.
- ❖ Antioxidantes no enzimáticos: en este grupo pueden distinguirse los antioxidantes hidrosolubles y los liposolubles. Entre los primeros (importantes en el citoplasma, estroma cloroplástico, etc.) destacan el ácido ascórbico y el glutatión (Foyer y cols., 1994). Entre los antioxidantes liposolubles (presentes en membranas) se encuentran los carotenoides (carotenos y xantofilas) (Young, 1991) y el  $\alpha$ -tocoferol (Munné-Bosch y Alegre, 2002).

A continuación se describen los enzimas estudiados en el trabajo que se recoge en la presente memoria:

### **Catalasa (CAT)**

Catalasa es un enzima con actividad peroxidasa, se encarga de detoxificar el  $H_2O_2$ , de la misma forma que el APX pero sin utilizar ningún co-factor como fuente de electrones. Esta ventaja energética frente a otras peroxidases es contrarrestada por la baja afinidad del enzima por el  $H_2O_2$ . Protege a las células de los efectos tóxicos que pueda generar el  $H_2O_2$  al catalizar su descomposición en oxígeno y agua. Se trata de hemoproteínas en las que cada monómero contiene un grupo Fe (III) en su centro catalítico y, NADPH o un dominio de tipo flavodoxina para prevenir la acumulación de una forma inactivada de Fe (IV) (Perl-Treves y Perl, 2002).

El enzima catalasa es activo sólo a altas concentraciones de  $H_2O_2$ , situación que se da en los peroxisomas y glioxisomas, donde existen distintas isoformas del enzima (Kuk y cols., 2003; Singh y cols., 2010). Es especialmente abundante en los peroxisomas, donde tiene lugar la fotorespiración (Engel y cols., 2006; Feierabend, 2005; Vuleta y cols., 2010). La función de CAT sería eliminar todo el exceso de  $H_2O_2$  antes de que se difunda hacia el citoplasma y pueda reaccionar con otras biomoléculas. Se han encontrado isoformas de este enzima en el citosol y en las mitocondrias, pero su presencia no ha podido ser constatada en los cloroplastos (Perl-Treves y Perl, 2002).



### **Ascorbato peroxidasa (APX)**

El APX es un enzima que contiene un grupo hemo y requiere de la presencia del ascorbato en cantidades considerables para su estabilidad y funcionalidad. Este enzima reduce el  $H_2O_2$  a agua utilizando el ascorbato como co-factor. La oxidación de este ascorbato produce el radical monohidroascorbato (MDHA).

En los cloroplastos podemos encontrar dos formas de APX: una unida a la membrana tilacoidal y la otra soluble en el estroma del cloroplasto. También en el citoplasma podemos encontrar otra isoforma soluble de APX.

#### **1.7.5. Situaciones de estrés y estrés oxidativo**

La exposición de las plantas a condiciones de elevada salinidad, a temperaturas extremas, a concentraciones elevadas de metales pesados en el sustrato, a radiación ultravioleta, a la contaminación atmosférica, a estrés por sequía o a condiciones de anoxia, provoca una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que afectan negativamente al crecimiento y productividad de los cultivos. Los mecanismos por los cuales se pueden generar las ROS son muy variables, y a menudo su relación con el estrés puede resultar compleja. Las plantas son capaces de percibir el estrés y responder con diversas estrategias para poder sobrevivir (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Existe pues una relación entre el estrés oxidativo y el estrés inducido por salinidad, por déficit hídrico y por virus:

- ❖ El estrés iónico, junto al estrés osmótico que conlleva la salinidad, puede provocar la formación de ROS. La salinización del sustrato o del agua de riego ejerce un efecto negativo sobre la planta y en concreto sobre los procesos metabólicos que tienen lugar en las mitocondrias y en los cloroplastos; aunque no se conoce con certeza el efecto que tiene la salinidad sobre la producción de ROS en estos orgánulos celulares. La salinidad provoca el cierre estomático, lo cual podría estar relacionado con la bajada en la disponibilidad de  $CO_2$ . Esta falta de sustrato para la reducción asimilativa, podría conducir finalmente a la derivación de los electrones hacia otras especies y la producción de ROS (Arbona y cols., 2003).
- ❖ El estrés hídrico atenúa el crecimiento de la planta y provoca la deshidratación celular, al ser liberada parte del agua del citosol y de la vacuola al espacio extracelular; además, se incrementa la producción de ROS y disminuye la actividad fotosintética, además de otros procesos metabólicos. La limitación de la fotosíntesis detectable ante un estrés hídrico moderado se debe a una disminución de la disponibilidad de  $CO_2$  consecuencia del cierre estomático regulado por ABA (McAinsh y cols., 1996). El estrés hídrico

provoca la casi completa inhibición de la síntesis proteica, y la inactivación de diversos enzimas en el cloroplasto. En este orgánulo también se ha observado un desequilibrio en las cadenas de transporte electrónico además de un incremento de la permeabilidad de las membranas (Iturbe-Ormaetxe y cols., 1998).

- ❖ La respuesta coordinada de las plantas a diferentes estímulos está mediada por la producción de distintas ROS. Un ejemplo es la resistencia sistémica adquirida: el agente patógeno induce una respuesta sistémica a través de ROS móviles que conducen a la adquisición de resistencia frente a la infección, incluso en tejidos lejanos a los puntos de entrada del patógeno. Se ha comprobado que las ROS están también implicadas como señalizadores en otros fenómenos que tienen lugar en las plantas como la formación de tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* o la muerte celular programada en reacciones hipersensibles (Perl-Treves y Perl, 2002).

En definitiva, tanto los estreses abióticos, como la salinidad y el estrés hídrico, como los bióticos, como es el estrés inducido por virus, producirán daño oxidativo si la capacidad antioxidante es superada por la generación de ROS. Sin embargo, tanto la producción de ROS como la respuesta antioxidante es variable de acuerdo a la especie y la severidad del estrés (Iturbe-Ormaetxe y cols., 1998).

### **1.8. REGULACIÓN HORMONAL DE LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS**

La naturaleza sésil de las plantas implica que éstas han de ser capaces de desarrollar distintos mecanismos de respuesta frente a todos los cambios externos, bien sean favorables o adversos. Así, durante millones de años las plantas han desarrollado una red de interacciones entre diferentes compuestos de naturaleza química variada que actúan promoviendo una serie de respuestas frente al estrés.

Entre los compuestos químicos implicados en la respuesta de las plantas al estrés se encuentran las hormonas vegetales o fitohormonas. Su acción es muy diversa y no se puede establecer una relación unívoca entre un efector hormonal y una determinada respuesta fisiológica (Alonso-Ramirez y cols., 2009; Gómez-Cadenas y cols., 1996; 1998; 2000).

Entre los compuestos con actividad hormonal que están implicados de forma más directa con las respuestas de las plantas frente al estrés están los ácidos abscísico, jasmónico y salicílico.

### 1.8.1. Ácido abscísico (ABA)

El ABA es un sesquiterpenoide que es sintetizado principalmente a partir del ácido mevalónico en cloroplastos y otros plastos (Figura 1.1). Se puede encontrar en forma libre o conjugada con diversas moléculas orgánicas: azúcares, aminoácidos, etc. Su forma activa es la libre, y la conjugación con diferentes ligandos constituye una forma de inactivación (Sauter y cols., 2002; Wilkinson y Davies, 2002).

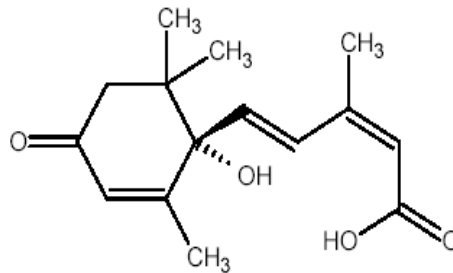


Figura 1.1. Estructura química del ácido abscísico (ABA).

Actúa como mediador entre la percepción del estrés y la promoción de la respuesta a través de la inducción de otras fitohormonas, por lo que juega un papel clave en la regulación de las respuestas de las plantas frente a los factores ambientales (Srivastava, 2002). Su acumulación en cítricos bajo condiciones de estrés hídrico se ha asociado, al incremento en el contenido de ACC. La inhibición de la síntesis de ABA reduce la acumulación del ACC, la producción de etileno y la abscisión foliar en cítricos sometidos a estrés hídrico y posterior rehidratación (Gómez-Cadenas y cols., 1996). Regula el cierre estomático, mediante la activación de la acción de los canales iónicos situados en las células oclusivas de los estomas, y la actividad fotosintética para ajustar los dos parámetros al estado hídrico de la planta (Levchenko y cols., 2005; Wilkinson y Davies, 2002). Controla la entrada y el mantenimiento del estado de dormición en semillas de diferentes especies de gramíneas (Ho y cols., 2003). Se ha comprobado también, que su aplicación exógena ejerce cierto efecto beneficioso sobre las plantas incrementando la capacidad antioxidante y la tolerancia a diversos factores de estrés ambiental (Gómez-Cadenas y cols., 2002). Este efecto beneficioso posiblemente se ejerce a través de la síntesis de diversas proteínas implicadas en la protección de la planta frente al estrés (Jiang y Zhang, 2004; Zhou y cols., 2005).

### 1.8.2. Ácido jasmónico (JA)

El JA es una molécula derivada de ácidos grasos oxigenados a través de la ruta octadecanónica. Es un derivado ciclopentanona del ácido linoléico (Sembdner y Parthier, 1993) que se caracteriza por la presencia de un anillo de pentano unido a dos residuos alifáticos (Figura 1.2).

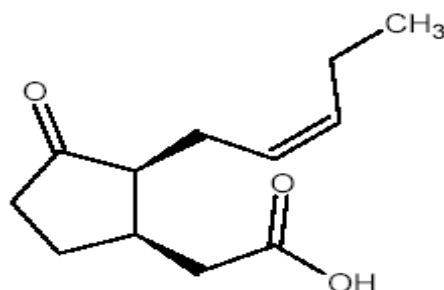


Figura 1.2. Estructura química del ácido jasmónico (JA).

La primera molécula de este grupo que se descubrió y caracterizó fue el metil jasmonato (MeJA) a principios de los años 60. Desde entonces, se le han atribuido numerosas actividades relacionadas con la inhibición del crecimiento, inducción de la senescencia, etc. (Wasternack, 2007). Además se sabe que no sólo la forma ácido libre del jasmónico y su metil éster tienen actividad biológica, sino también la mayor parte de sus precursores (Miersch, 1991; Schaller y cols., 2005). Su actividad engloba un gran número de procesos en las plantas; entre los más importantes se pueden citar las interacciones planta-microorganismo donde se ha descrito una interacción coordinada de los jasmonatos con otras fitohormonas como el etileno o el ácido salicílico. La relación del etileno con los jasmonatos puede ser antagónica (como en el caso de la síntesis de nicotina en la interacción planta-herbívoro, o en la muerte celular inducida por el  $O_3$ ) o sinérgica (como en el caso de la expresión de genes de defensa frente a patógenos). En el caso del ácido salicílico, las interacciones descritas con los jasmonatos son únicamente de tipo antagónico (Pozo y cols., 2005). El JA participa en la señalización de las respuestas vegetales frente a diversos estreses de tipo abiótico como el salino (Abdala y cols., 2003; Tsonev y cols., 1998), el osmótico (Kramell y cols., 1995), el hídrico (Wang, 1999), el inducido por bajas temperaturas (Lee y cols., 1996) y por metales pesados (Xiang y Oliver, 1998). En los cítricos, los jasmonatos podrían tener junto con el ABA, algún tipo de implicación en el cuajado del fruto, así como en su abscisión prematura (Pozo, 2001). El JA también está implicado en la inducción de la maduración organoléptica en diversos frutos climatéricos mediante la regulación positiva o negativa de la producción de etileno (Peña-Cortés y cols., 2005).

### 1.8.3. Ácido salicílico (SA)

La biosíntesis del ácido salicílico (SA) deriva del ácido cinámico a través de la ruta fenilpropanoica (Figura 1.3).

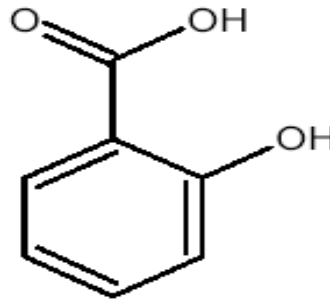


Figura 1.3. Estructura química del ácido salicílico (SA).

El SA está implicado en la germinación de las semillas (Rajoy y cols., 2006), el crecimiento celular (Rate y cols., 1999), la respiración (Norman y cols., 2004), el cierre estomático (Mateo y cols., 2004; 2006), y la expresión de genes de senescencia (Morris y cols., 2000). Además, juega un papel importante en la formación de nódulos en leguminosas (Stacey y cols., 2006), en la termotolerancia basal (Clarke y cols., 2004), en la formación de frutos (Silverman y cols., 1995) y en la resistencia a patógenos mediante el estímulo de la síntesis de proteínas implicadas en la resistencia (Raskin, 1995). Se ha descrito que su acción está relacionada con otras hormonas como el JA y el etileno en la interacción planta-patógeno. La acción secuencial de las tres fitohormonas juega un papel fundamental en la señalización de las respuestas fisiológicas (O'Donnell y cols., 2003). En dos revisiones recientes (Pozo y cols., 2005; Rojo y cols., 2003) se postula una relación antagónica entre JA y SA a través de la inhibición recíproca de su biosíntesis.

## 1.9. CULTIVO *IN VITRO* DE LAS PLANTAS SUPERIORES

El cultivo de tejidos es una herramienta de gran valor para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal, ya que por una parte ofrece una serie de sistemas modelo ideales para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural, y por otro lado tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material (George y cols., 2008).

### 1.9.1. Fundamentos

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo, en condiciones asépticas de órganos, tejidos y células, empleando medios nutritivos artificiales, en condiciones controladas de temperatura, humedad, iluminación y fotoperiodo.

Todas las células vegetales, siempre y cuando se encuentren en un medio adecuado, poseen la capacidad potencial de regenerar el organismo completo, es lo que se denomina totipotencia. Los procesos que permiten la regeneración de plantas completas a partir de diferentes explantos se pueden clasificar en:

- ❖ Organogénesis: es el proceso por el que las células y tejidos son forzados a sufrir cambios que conducen a la formación de meristemas, bien caulinares o, en menor medida radicales, a partir de los cuales se desarrollarán el resto de tejidos de la planta.
- ❖ Embriogénesis somática: es el proceso que conduce a la formación de una estructura bipolar, en la que están presentes un meristemo caulinar y un meristemo radicular, que forman un eje brote/ raíz, con un sistema vascular independiente (embrión somático) a partir del cual se desarrollará una planta.

En los sistemas artificiales de cultivo, es necesario añadir al medio nutritivo sintético todos aquellos nutrientes, vitaminas, reguladores del crecimiento, etc. que las células, tejidos u órganos reciben, en condiciones naturales, a través de las raíces o de los órganos fotosintetizadores. Esto es debido a que en ocasiones se mantienen *in vitro* cultivos de células o tejidos y, en el caso de cultivar plantas completas, éstas tienen su capacidad fotosintética reducida como consecuencia de las condiciones propias del sistema de cultivo (como una humedad dentro del recipiente de cultivo del 100 %) y no han desarrollado una cutícula y los estomas no son totalmente funcionales. Es necesaria una fase de aclimatación de las plantas obtenidas *in vitro* a las condiciones de cultivo en invernadero, con una iluminación mayor y una humedad relativa menor a la que tenían en el recipiente de cultivo (Debergh y Zimmerman, 2001).

### 1.9.2. Aplicaciones del cultivo de tejidos *in vitro* en biotecnología vegetal

Cuando las especies que se propagan de forma vegetativa son infectadas por virus, éstos son transmitidos, con alta eficiencia, desde la planta madre a la descendencia. Se ha conseguido el saneamiento de una gran cantidad de especies que se multiplican por bulbos, tubérculos,

esquejes o estacas que estaban infectadas por diferentes virosis a través de la regeneración de plantas *in vitro*. El sistema más utilizado y con mayores éxitos es el cultivo de meristemos, suplementado en muchos casos, por tratamientos de termoterapia o quimioterapia (Fraccioli y Marani, 1998). En otras especies vegetales leñosas como los cítricos, la vid, el manzano y otros el cultivo de meristemos caulinares *in vitro* no ha permitido la recuperación de plantas completas. Como alternativa para lograr plantas libres de patógenos, se ha utilizado la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (George y cols., 2008).

La micropropagación se utiliza a escala comercial para la multiplicación de gran cantidad de plantas herbáceas y de numerosos genotipos leñosos. La producción masiva de embriones somáticos y la capacidad de desarrollar plantas completas a partir de los mismos, presenta un elevado potencial en la tecnología de semillas artificiales en especies forestales (Dumet, 1994). En la mayoría de los casos la propagación se lleva a cabo mediante la brotación de yemas axilares (George y cols., 2008).

Cuando la conservación de semillas no asegura la viabilidad de un banco de germoplasma (en el caso de cultivares altamente heterocigóticos; en especies de cítricos monoembriónicas; en cultivares sin semilla, como muchos cítricos, plátanos, etc.; en plantas que producen tubérculos, etc.) las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* ofrecen alternativas a las formas tradicionales de conservación basadas en colecciones de plantas cultivadas en campo (Pérez, 2000).

Además, se pueden cultivar *in vitro* embriones zigóticos con el propósito de recuperar híbridos que, en condiciones naturales, abortan debido a la incompatibilidad resultante de cruces interespecíficos o intergenéricos o a su inmadurez. Cuando los efectos fisiológicos ocurridos en el ámbito de la semilla impiden o limitan el desarrollo de los embriones, la extracción del embrión y su cultivo en un medio nutritivo adecuado permite el desarrollo óptimo de la plántula (Tanji, 2002).

La variación somaclonal puede ser inducida en los cultivos *in vitro* con el fin de generar variabilidad genética que puede ser explotada directamente o en posteriores programas de mejora (George y cols., 2008). El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una herramienta indispensable para la transformación genética de especies de interés agronómico y ornamental. La transformación genética consiste en la introducción de genes foráneos en el genoma de algunas células vegetales a partir de las cuales se generan plantas completas fértiles. La expresión de estos genes en la planta implica una modificación puntual de la variedad de partida sin alterar el resto de las características propias de dicha variedad. Esto ha permitido disponer de una herramienta muy útil para la mejora de especies cultivadas, eludiendo algunas de las técnicas de la mejora convencional.

Las técnicas de transformación de genes más utilizadas han sido la transformación mediada por *Agrobacterium* sp., la transferencia directa a protoplastos mediante tratamientos químicos o eléctricos y la transferencia directa a células y tejidos mediante bombardeo de microproyectiles. En todos los casos, el éxito de la obtención de plantas transgénicas depende de la frecuencia de la transferencia de genes y de la posibilidad de diferenciación de las células, siendo este último el factor más limitante en la mayoría de las especies recalcitrantes a la transformación genética (Pérez-Clemente y cols., 2004).



## **2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**



## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo es profundizar en el conocimiento de las bases fisiológicas de las respuestas de los cítricos al estrés biótico y abiótico. A continuación se describen los objetivos específicos que se han buscado en la investigación:

### I. Estudio de la fisiología de los cítricos en condiciones de estrés osmótico

En este estudio se ha empleado el patrón citrange Carrizo que muestra una elevada sensibilidad al estrés hídrico. Plantas intactas y brotes aislados de este genotipo se han sometido a diferentes tratamientos osmóticos. Para ello se ha diseñado, en primer lugar, un sistema que ha permitido el establecimiento de las condiciones óptimas para el cultivo y propagación *in vitro* de cítricos. Se ha estudiado los daños inducidos por el estrés y la acumulación de prolina, tanto en la parte aérea como en el sistema radicular, así como la regulación hormonal determinando el patrón de acumulación de ABA, JA y SA. Se ha estudiado también, el daño oxidativo provocado por el estrés osmótico mediante la determinación de MDA junto con la respuesta antioxidante vegetal.

### II. Estudio de la fisiología de los cítricos en condiciones de estrés salino

El objetivo ha consistido en profundizar en el conocimiento de las respuestas fisiológicas y bioquímicas de distintas especies de cítricos, sometidas a estrés salino, obviando el efecto de filtro de iones  $\text{Cl}^-$  de las raíces. Para ello se han elegido tres patrones de cítricos ampliamente utilizados en la citricultura española, que muestran diferente tolerancia al estrés salino: citrange Carrizo, citrumelo CPB 4475 y mandarino Cleopatra. Tras cultivar plantas de los tres genotipos *ex vitro* e *in vitro* en medio salinizado, se ha determinado el contenido de prolina, iones  $\text{Cl}^-$ , ABA, SA y MDA, discutiendo los posibles mecanismos bioquímicos de adaptación diferenciales entre patrones sensibles y tolerantes a la salinidad.

### III. Estudio de la fisiología de los cítricos en condiciones de estrés inducido por virus

Para profundizar en el conocimiento de las respuestas de los cítricos al CTV se han considerado aspectos fisiológicos y morfológicos. Como modelo experimental se ha utilizado un genotipo muy sensible a la enfermedad que se ha infectado con dos cepas de diferente virulencia. Se ha estudiado los daños inducidos por el virus en la planta y la concentración de prolina en hojas. Además, se ha estudiado el comportamiento de la maquinaria fotosintética en condiciones de estrés biótico, determinando parámetros de intercambio gaseoso ( $A$ ,  $E$ ,  $g_s$ ,  $C_i/C_a$ ) así como de fluorescencia de clorofilas ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $F_0$  y NPQ). Se ha determinado la concentración de MDA como marcador del daño oxidativo que el virus provoca en las plantas. También, se ha estudiado la respuesta antioxidante vegetal mediante el análisis de las actividades enzimáticas CAT y APX. Junto a estos parámetros, se ha determinado el patrón de acumulación de ABA, JA y SA, y se ha realizado un perfilado metabólico.



### **3. ESTRÉS OSMÓTICO EN CÍTRICOS**



### 3. ESTRÉS OSMÓTICO EN CÍTRICOS

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son plantas de origen tropical y necesitan para su correcto desarrollo un ambiente húmedo tanto en el suelo como en la atmósfera. Sus necesidades hídricas se estiman entre 7,500 y 12,000 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> al año (Agustí, 2003). En la zona mediterránea además de no alcanzarse los valores de precipitación necesarios, la lluvia no se distribuye homogéneamente a lo largo del tiempo, alternándose periodos muy secos con periodos de lluvias torrenciales. Con tales condiciones, el cultivo comercial debe ir acompañado de riego artificial, pero aún así, los cítricos pueden verse con frecuencia sometidos a condiciones de estrés hídrico (Agustí, 2003). La exposición de las plantas a un ambiente con limitaciones de agua durante varios estadios de desarrollo parece activar múltiples cambios fisiológicos y bioquímicos (Araus, 2004).

Para evitar las pérdidas por transpiración durante el estrés por sequía, la primera respuesta de las plantas es el cierre de estomas (Gómez-Cadenas y cols., 1996; Mansfield y Atkinson, 1990). Como consecuencia del cierre de estomas se produce una reducción de la concentración de CO<sub>2</sub> disponible que da lugar a una sobrerreducción de los componentes de la cadena de transporte electrónico (Brakke y Allen, 1995). En una situación en que el estrés hídrico sea muy intenso y prolongado, la pérdida de agua provoca daños y la marchitez de las hojas. Para evitar este proceso las plantas disminuyen su potencial osmótico celular con la acumulación de solutos en el citoplasma y esto ayuda al movimiento de agua hacia el interior de la célula aumentando su turgencia. La prolina es uno de los aminoácidos que más se acumula como respuesta a distintos tipos de estrés como sequía (Kishor y cols., 1995). Sin embargo, el incremento de solutos puede llegar a niveles tóxicos pudiendo afectar al correcto funcionamiento de algunas enzimas (Foyer y Noctor, 2005; García-Sánchez y cols., 2007).

Durante el estrés hídrico indirecto causado por la inundación del sustrato, los niveles de actividad de algunas enzimas antioxidantes como CAT, APX y GR aumentan, protegiendo a la célula de la oxidación por ROS (Arbona y cols., 2008; Hossain y cols., 2009). Además, los datos publicados en Arbona y cols. (2008) sugieren que la prolina tiene una mínima acción protectora frente a dicho estrés. Existe una relación directa entre la sensibilidad de los cítricos al estrés por inundación y la acumulación temprana de MDA.

En plantas adultas de cítricos, el estrés hídrico afecta a múltiples parámetros fisiológicos. Se inhibe el crecimiento vegetativo, se produce una disminución en el perímetro del tronco, en el crecimiento de los brotes y en el desarrollo foliar (Ortuno y cols., 2004). Por otra parte, un estrés hídrico seguido de rehidratación también produce floración (Krajewski y Rabe, 1995).

Los cítricos sometidos a sequía severa pueden mostrar lesiones foliares e incluso hojas marchitas pero sin llegar a producirse la abscisión (Tudela y Primo-Millo, 1992). Sin embargo, cuando el estrés se reduce por la lluvia o el riego, las hojas recuperan la turgencia y poco después, se produce la abscisión (Gómez-Cadenas y cols., 1996; Tudela y Primo-Millo, 1992). Esta respuesta se explica por el hecho que en condiciones de estrés hídrico severo se promueve la síntesis y acumulación de 1-aminociclo-propano-1-carboxílico (ACC; precursor metabólico de etileno) en las raíces (Tudela y Primo Millo, 1992). La rehidratación de las plantas hace que el ACC se transporte a los brotes, donde se oxida a etileno y promueve la abscisión foliar (Arbona y cols., 2005; Tudela y Primo-Millo, 1992). El ABA parece desempeñar una función primordial en la coordinación de la magnitud del estrés osmótico con la intensidad de la respuesta frente al estrés, mientras que el etileno, parece actuar como desencadenante de la respuesta vegetal en forma de pérdida foliar (Gómez-Cadenas y cols., 1996). Por otra parte, el ABA está implicado en dos procesos importantes durante el estrés hídrico, por un lado en el balance hídrico a través de la regulación de la apertura y cierre de estomas, y por otro en la inducción de genes que codifican proteínas que protegen a las células de la deshidratación (Yamaguchi- Shinozaki y Shinozaki, 2006).

En una serie de experimentos con árboles cultivados en campo, Mahouachi y cols. (2005) demostraron que también la síntesis de giberelinas puede estar reprimida por estrés hídrico en este cultivo. Además, mediante experimentos donde se combinaron ciclos de estrés y rehidratación se comprobó que la sequía afecta negativamente al cuajado del fruto.

Una de las limitaciones en el estudio de las respuestas fisiológicas de los cítricos al estrés hídrico consiste en encontrar un sistema experimental adecuado. Muchas de las respuestas hormonales se han evidenciado en sistemas de choque hídrico muy severos (Gómez-Cadenas y cols., 1996; Tudela y cols., 1992). En el otro extremo, en los experimentos de campo no es posible controlar el estrés impuesto debido a las condiciones climáticas cambiantes (Mahouachi y cols., 2005). Debido a estos problemas, algunas de las respuestas de las plantas al estrés hídrico se han obtenido utilizando sistemas que inducen un estrés hídrico indirecto en la parte aérea debido al mal funcionamiento de la raíz (Arbona y Gómez-Cadenas, 2008; Arbona y cols., 2008; 2009a).

Con estos antecedentes, parece justificado plantear un sistema *in vitro* que permita el estudio detallado de las respuestas fisiológicas de los cítricos sometidas a condiciones de estrés hídrico. Este sistema permitiría imponer estreses osmóticos o salinos de forma continua y en condiciones controladas.



## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Material vegetal y medios de cultivo

#### 3.2.1.1. Ajuste de las condiciones de cultivo *in vitro* y obtención de material vegetal

En una primera serie de experimentos llevados a cabo *in vitro*, se utilizó como fuente de material vegetal plantas de citrange Carrizo (*Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf., CC) cultivadas en el invernadero. Se cortaron varetas de 15 cm de longitud y se eliminaron sus hojas, se desinfectaron por inmersión durante 10 min en una solución al 2 % (v/v) de hipoclorito de sodio con 0.1 % (v/v) de agente humectante Tween 20. Después se lavaron tres veces con agua desionizada estéril. Se cortaron segmentos nodales de 1 cm de largo y se cultivaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían 25 mL de medio basal (MB), constituido por las sales inorgánicas de Murashige y Tucker (1969), 100 mg L<sup>-1</sup> i-inositol, 1 mg L<sup>-1</sup> piridoxina-HCl, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 40 mg L<sup>-1</sup> de adenina y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. El pH se fijó en 5.7 ± 0.1 con NaOH 0.1 N antes de esterilizar. El medio se gelificó con la adición de 9 g L<sup>-1</sup> de agar (Pronadisa, Madrid, España).

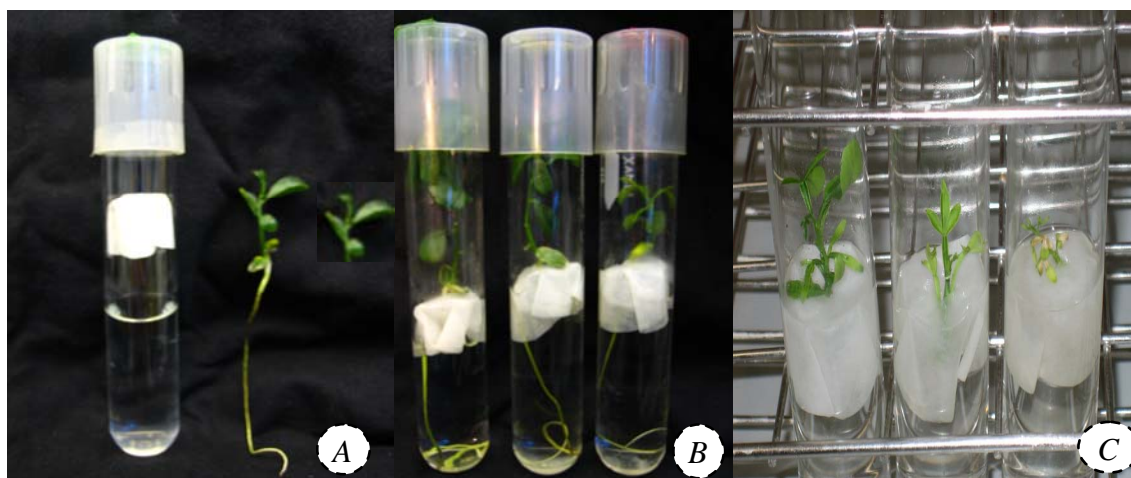
Con el fin de disponer de suficiente cantidad de material vegetal para realizar los ensayos, se procedió a la micropropagación de las plantas obtenidas a partir de la brotación de las yemas de los segmentos nodales. Para ello los brotes se cultivaron individualmente en tubos de ensayo, y como medio de cultivo se utilizó un medio de multiplicación (MM) para promover el desarrollo de yemas axilares. El MM consistió en medio MB suplementado con 0.4 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). Pasado un periodo de tiempo de 15 días, los brotes obtenidos se individualizaron y se cultivaron en un medio de elongación (ME) para que alcanzaran una altura de 15 mm. Este medio consistió en el medio MB suplementado con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Los cultivos se mantienen con un fotoperiodo de 16 horas (h) de luz y 8 h de oscuridad, temperatura de 26.0 ± 0.1 °C y con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de 70 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Otra parte del experimento se desarrolló utilizando plantas con sistema radicular intacto. El material vegetal para este ensayo se obtuvo mediante la desinfección y cultivo de semillas *in vitro* en medio MB en condiciones de oscuridad. Tras dos semanas en oscuridad, las plantas se transfirieron a las condiciones de cultivo descritas para brotes. Cuando la plántula desarrolló una raíz de aproximadamente 3 cm de longitud, se seleccionaron las plántulas sanas para cultivarlas en el medio de tratamiento.

### 3.2.1.2. Ajuste del sistema de cultivo más adecuado para el cultivo y determinación de la concentración de PEG-6000

El medio de cultivo utilizado para el estudio fue el medio ME. Como soporte mecánico tanto para los brotes como para las plantas, se utilizó un disco de papel de filtro autoclavado, con un orificio central para colocar el tallo (Figura 3.1).

Para estudiar la tolerancia al estrés hídrico en condiciones controladas se añadieron diferentes concentraciones de polietilén-glicol-6000 (PEG-6000) al medio de cultivo ME.



**Figura 3.1. Imágenes del cultivo *in vitro* de plantas intactas y de brotes aislados de citrange Carrizo.** (A) Sistema de cultivo *in vitro* (izquierda), tanto de planta intacta (centro) como de brote aislado (derecha) a 0 ddt. (B) Plantas intactas cultivadas en medio control (izquierda), PEG075 (centro) y PEG150 (derecha) después de 10 días. (C) Brotes aislados cultivados medio control (izquierda), PEG050 (centro) y PEG075 (derecha) después de 30 días.

Para obtener un determinado potencial osmótico en el medio de cultivo, se utilizó la fórmula de Michel y Kaufmann (1973) y se determinaron los gramos de PEG-6000 necesarios. Para confirmar el valor del potencial osmótico en el medio de cultivo, éste se midió mediante un osmómetro.

La concentración de PEG-6000 más adecuada para el estudio fue aquella que causase en las plantas los daños propios del estrés por deshidratación, sin llegar a causar la muerte de la planta. Se añadieron concentraciones crecientes de PEG-6000 al medio ME: 10.10 (PEG025), 20.20 (PEG050), 25.00 (PEG075), 33.30 (PEG100) o 37.76 (PEG150) % (p/v). Se utilizó como control los brotes cultivados en ME. Después de 10, 20 y 30 días en cultivo se determinó el porcentaje de plantas afectadas por deshidratación. Estos datos permitieron seleccionar PEG075 y PEG150 como tratamientos de estrés hídrico moderado y severo respectivamente, para los

experimentos con planta enraizada. Para los experimentos en los que el material vegetal eran sólo brotes, los medios seleccionados fueron PEG050 y PEG075.

En todos los experimentos, el material vegetal se cultivó en cámaras de cultivo en las condiciones descritas en el Apartado 3.2.1.1.

### **3.2.2. Seguimiento del cultivo y recogida de datos**

#### **3.2.2.1. Síntomas visibles de daños en plantas y brotes**

Los síntomas que se observan en las plantas sometidas a este tipo de estrés son: amarillamiento de las hojas, necrosis en la zona distal del limbo, así como en los ápices y en las raíces, abscisión foliar, acucharamiento y disminución del sistema radicular, principalmente. Por lo tanto, para cuantificar los daños foliares en estos experimentos, se registró de forma periódica diferentes parámetros:

1. Para cuantificar el número de plantas afectadas se consideró que un brote afectado era aquel que mostraba al menos un 50 % de sus hojas afectadas. Mientras que se consideraba que una planta enraizada estaba afectada cuando mostraba al menos el 50 % de las hojas afectadas y/o mostraba daños en la raíz. El número de plantas afectadas se representó en valores porcentuales respecto del total de plantas sometidas a estrés.
2. Para constatar la evolución de la sintomatología foliar y radicular característica del estrés hídrico en plantas tratadas con respecto a plantas control se realizaron fotografías de las plantas y se tomaron datos de las hojas y las raíces de forma periódica.
3. Para cuantificar los efectos del estrés osmótico en el crecimiento de las plantas se realizaron mediciones de la longitud del brote y de la raíz de cada una de las plantas.
4. Para cuantificar el daño provocado por el déficit hídrico en la parte aérea se anotaron el número de hojas sin síntomas aparentes, hojas deshidratadas y hojas necrosadas de cada bote. Los datos se representaron realizando el sumatorio de las hojas que mostraban un determinado síntoma con respecto al total de hojas desarrolladas en los brotes para cada tratamiento. Se anotó también el número de ápices necrosados en cada caso.
5. A su vez, para cuantificar los síntomas observados en la raíz después del tratamiento y su evolución a lo largo del tiempo, se anotó el número de plantas con deformación o necrosamiento del ápice. Se tomaron medidas del diámetro de la raíz y se cuantificó el número de plantas con un sistema radicular con un diámetro menor que las plantas control.

Se tomaron datos a los 10, 20 y 30 ddt de un total de 500 plantas y 500 brotes para cada tratamiento y día de cultivo.

### 3.2.2.2. Obtención de material vegetal para las determinaciones analíticas

El material vegetal se recogió por separado (por un lado hojas y tallos y por otro el sistema radicular de plantas intactas) y se lavó con agua destilada para eliminar cualquier residuo. Seguidamente se trituró y congeló en nitrógeno líquido. El material vegetal se conservó en un congelador a -80 °C hasta su utilización posterior.

### 3.2.2.3. Análisis de malondialdehído (MDA)

La cuantificación del daño oxidativo provocado por el estrés hídrico se realizó mediante el análisis de la concentración de MDA, siguiendo el método descrito por Hodges y cols. (1999). Para llevar a cabo la extracción del MDA se homogeneizaron 0.5 g de tejido vegetal fresco con etanol al 80 % (grado PRS, Scharlau, Barcelona, España) con la ayuda de un dispersador (Ultra-Turrax, IKA-Werke, Staufen, Alemania) y se centrifugó a 4400 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Después, una alícuota del sobrenadante se hizo reaccionar, por un lado, con ácido tricloroacético (TCA, grado ACS, Panreac, Barcelona, España) al 20 % (p/v), y por otro, con una mezcla de TCA al 20 % (p/v) y ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 0.5 % (p/v). Ambas mezclas se dejaron reaccionar a 90 °C en baño termostático durante una hora. Al finalizar, se dejaron enfriar en baño de hielo durante 15 minutos. A continuación, se centrifugaron nuevamente a 4400 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente, se leyó la absorbancia (Abs) a 440, 532, 600 nm, en el espectrofotómetro (Thermo Spectronic) sobre la reacción del extracto con la mezcla de TCA y TBA; y a 532 y 600 nm sobre la reacción del extracto con TCA. La concentración de MDA en los extractos se calculó como se describe en Arbona y cols. (2008).

### 3.2.2.4. Determinación de la actividad enzimática antioxidante

Para determinar la actividad del enzima ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) se utilizaron 0.25 g de tejido fresco y se homogeneizaron en 2.5 mL de solución de extracción con la ayuda de un mortero a 4 °C. Esta solución de extracción consistió en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.1 suplementado con ascorbato sódico 0.2 mM y EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM. El homogenado resultante se filtró a través de una doble capa de tela de muselina y se centrifugó a 3000 rpm durante 45 min a 4 °C. Después se diluyó en proporción 1:5 con el mismo tampón fosfato sódico antes de realizar el análisis.

El análisis de la actividad del enzima APX se realizó según el método espectrofotométrico descrito por Asada (1984), en el cual se mide la disminución de la absorbancia a 290 nm como consecuencia del consumo del ascorbato sódico en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Se corrigió la pendiente de actividad del APX realizando una recta de calibrado por el método de Bradford (1976) tomando los datos del análisis del ascorbato oxidasa (que consume ascorbato con independencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y también con los datos de la oxidación inespecífica del

ascorbato producida por el  $H_2O_2$ . Una vez finalizado el proceso, se determinó la actividad del enzima APX con el espectrofotómetro a 290 nm. La actividad enzimática que produce la oxidación de 1 mmol de ascorbato por minuto se tomó como una unidad de APX, de acuerdo con la bibliografía (Asada, 1984).

Para determinar la actividad del enzima catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) se homogeneizaron 0.15 g de tejido con tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6.8, filtrando el homogenado y centrifugándolo como se ha descrito para APX. El análisis enzimático se realizó según el método descrito por Brennan y Frenkel (1977), en el que se utiliza un reactivo de titanio para valorar la concentración de  $H_2O_2$  en disolución, la reacción del titanio con el  $H_2O_2$  produce hidroperóxido de titanio que absorbe a 415 nm; la relación entre la concentración de  $H_2O_2$  y la absorbancia a 415 nm después de reaccionar con el reactivo de titanio es lineal dentro del rango estudiado. En nuestras condiciones el reactivo de titanio utilizado fue solución patrón comercial de titanio en HCl (Panreac, Barcelona, España). El extracto, diluido también 1:5 con el mismo tampón sódico, se analizó añadiendo 100  $\mu$ L a 900  $\mu$ L de una disolución de  $H_2O_2$  3 mM en tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.8 y manteniendo esta mezcla a 30 °C en baño termostatado. A 0, 7, 10, 15 y 20 minutos después de la adición del extracto enzimático se tomaron 150  $\mu$ L de la mezcla y se añadieron 850  $\mu$ L de una disolución de  $TiCl_4$ . Tal como se describe en la bibliografía (Brennan y Frenkel, 1977), se definió una unidad de actividad CAT como la actividad enzimática que metaboliza 1 mmol de  $H_2O_2$  por minuto.

Las actividades enzimáticas se expresaron como unidades arbitrarias por mg de proteína. El contenido en proteína del extracto diluido se determinó mediante el método descrito por Bradford (1976).

#### **3.2.2.5. Determinación de la concentración de prolina**

Para la determinación de la concentración de prolina, se homogeneizaron 0.05 g de tejido fresco en 5 mL de ácido sulfosalicílico al 3 % (Panreac, Barcelona, España) utilizando un dispersador (Ultra-Turrax, IKA-Werke, Staufen, Alemania). Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 4000 rpm durante 45 min a 4 °C y se recuperó 1 mL del sobrenadante. El análisis se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Bates y cols. (1973). El sobrenadante se combinó con 2 mL de una mezcla de ácido acético glacial y reactivo de ninhidrina (Panreac, Barcelona, España) en proporción 1:1 (v:v). Esta mezcla se dejó incubar a 100 °C en baño termostatado durante 1 h. Pasado este tiempo, se dejó enfriar en baño de hielo y se particionó la solución acuosa con 2 mL de tolueno. La fase orgánica se recuperó para medir la absorbancia a 520 nm. El valor obtenido se interpoló en una curva estándar realizada con prolina comercial (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

### 3.2.2.6. Determinación de fitohormonas

Para la determinación de las fitohormonas estudiadas se siguió el protocolo descrito en Arbona y Gómez-Cadenas (2008) y Durgbanshi y cols. (2005). Se pesaron 0.5 g de material vegetal fresco y se añadieron como patrones internos 100 ng de [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ABA (preparado según se describe en Gómez-Cadenas y cols., 2001b), 100 ng de ácido dihidrojasónico y 100 ng de [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-SA (Sigma-Aldrich, Madrid, España). A continuación, se añadieron 5 mL de agua desionizada. La mezcla se homogeneizó utilizando un dispersador (Ultra-Turrax, IKA-Werke, Staufen, Alemania) y se centrifugó a 4000 rpm durante 45 minutos a 4 °C. El pH del sobrenadante se ajustó a 3.0 con una solución de ácido acético al 15 % (v/v) y se hicieron dos particiones con 3 mL de éter etílico (grado ACS, Scharlau, Barcelona, España). La fase orgánica se recuperó y se secó a temperatura ambiente en una centrifuga de evaporación a vacío (RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain Cedex, Francia). El residuo seco resultante se resuspendió añadiendo primero 100 µL de metanol (grado HPLC, Scharlau) y sonicando durante 5 minutos. Posteriormente se completó el volumen hasta 1 mL con agua ultrapura (Nanopure™, Barnstead, RU) y se hizo pasar por filtros de celulosa regenerada de 0.2 µm de tamaño de poro. A continuación, el extracto se inyectó en un equipo de HPLC (Waters Alliance 2860, Waters Corp., Milford, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas en tándem con interfase de electrospray (Quattro LC, Micromass, Manchester, RU). La separación se llevó a cabo en fase reversa en una columna de C18 (Kromasil 100 C18 5 µm 100 x 2.0 mm, Scharlau) utilizando como solventes ácido acético al 0.01 % en agua ultrapura y metanol (grado HPLC, Scharlau, Barcelona, España). La detección de los compuestos se realizó en modo electrospray negativo (ES<sup>-</sup>). El tiempo de retención de cada fitohormona junto con su relación m/z y la de los respectivos iones producto se muestran en la Tabla 3.1. La cuantificación se realizó en base a una curva de calibrado inyectada previamente, tal y como se describe en Durgbanshi y cols. (2005).

**Tabla 3.1. Tiempo de retención y transiciones específicas para cada fitohormona.** En la columna de la derecha se indican las transiciones correspondientes a cada analito en modo ES<sup>-</sup>.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Transición (m/z)
ABA	11.70	263 > 153
JA	13.30	209 > 59
SA	8.20	137 > 93

### **3.2.3. Análisis estadístico**

Para la realización del ensayo se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados fueron analizados utilizando el programa informático S-PLUS 6.1 (Insightful Corporation). Los efectos de las diversas pruebas realizadas se determinaron mediante la aplicación del análisis de varianza unifactorial (ANOVA) y separación de medias (método de Tukey,  $p \leq 0.05$ ) de los datos.

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Establecimiento de las condiciones de cultivo idóneas para el estudio del estrés osmótico en CC

Para estudiar el efecto del estrés osmótico en cítricos, se seleccionó el genotipo CC, patrón sensible a la salinidad y al estrés hídrico, y se realizó un estudio previo para ajustar la dosis de PEG-6000 a aplicar en el medio de cultivo. Se cultivaron las semillas *in vitro* y después de 4 semanas se seleccionaron las plántulas con un tamaño similar y se cultivaron en las condiciones descritas en el Apartado 3.2.1. Se ensayaron concentraciones crecientes de PEG-6000 para alcanzar presiones osmóticas de -0.50 (PEG050), -0.75 (PEG075) y -1.50 MPa (PEG150).

Después de 20 días, las plantas cultivadas en medio PEG075 tenían un crecimiento radicular menor que las plantas control. Al final del experimento, las plantas cultivadas en condiciones de estrés osmótico moderado (PEG050) crecieron significativamente menos que las plantas control (un 10.00 % y un 11.00 % menos en parte aérea y radicular frente al control). Las plantas estresadas con una concentración más alta de PEG-6000 (PEG075), disminuyeron su crecimiento un 17.19 % en la parte aérea y un 10.48 % en la radicular. Mientras que, las plantas sometidas a un estrés osmótico severo (PEG150) experimentaron un crecimiento significativamente menor y, a los 30 ddt, crecieron un 34.69 % y un 34.47 % menos en la parte aérea y en la parte radicular, respectivamente, que las plantas control (Tabla 3.2).

A los 10 ddt se observaron síntomas de deshidratación en las hojas de las plantas cultivadas en los diferentes tratamientos. La severidad de los daños y el porcentaje de plantas afectadas fue aumentando con el tiempo de tratamiento. A los 30 ddt, el 31.52 % de las plantas cultivadas en medio PEG050 estaban afectadas, mientras que en las plantas cultivadas en medio con concentraciones de PEG-6000 más elevadas, el porcentaje de plantas superaba el 76.00 % (76.07, 79.01 y 93.56 % en medio PEG075, PEG100 y PEG150, respectivamente) (Tabla 3.3).

El sistema radicular también sufrió daños en plantas sometidas a condiciones de estrés. El 16.67 % de las plantas cultivadas en PEG075 mostraron necrosamiento del ápice radicular, porcentaje que aumentó de forma constante hasta el final del periodo experimental. Las plantas cultivadas en PEG050, mostraron daños en el sistema radicular a los 30 ddt (10.00 % de ápices radiculares necrosados) (Tabla 3.3).

En cuanto a las plantas cultivadas en condiciones de presión osmótica de -1.50 MPa, el daño causado por el déficit hídrico se observó desde el inicio del tratamiento y fue aumentando a lo largo de todo el periodo experimental. Por tanto, se consideró que las concentraciones de PEG-6000 más adecuadas para evaluar la tolerancia de las plantas intactas de cítricos cultivadas *in vitro* serían las alcanzadas en los medios de cultivo PEG075 (dosis baja) y PEG150 (dosis alta).



Del mismo modo, y para establecer las condiciones de cultivo que permitieran estudiar los efectos del estrés osmótico en brotes de CC cultivados *in vitro*, se ensayó el efecto de concentraciones crecientes de PEG en el medio de cultivo, que proporcionaron presiones osmóticas de -0.50, -0.75 y -1.00 MPa (Tabla 3.2 y 3.3).

Tras observar los síntomas causados en las hojas se consideró que la dosis de PEG-6000 que causaba daños moderados en los brotes asilados era la alcanzada en el medio PEG050 y la que causaba daños severos era la alcanzada en el medio PEG075.

### 3.3.2. Efecto del estrés osmótico en el crecimiento de las plantas intactas

El efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento de la parte aérea y de la parte radicular fue evidente durante todo el periodo experimental. Como se observa en la Tabla 3.2, la disminución en la tasa de crecimiento, respecto a las plantas control, fue mayor en las cultivadas en PEG150.

Después de 10 días de cultivo, la longitud de los tallos de las plantas sometidas a estrés severo era un 25.66 % menor que en plantas control, mientras que las plantas cultivadas en la dosis menor de PEG-6000 habían crecido un 27.26 % menos. Al final del periodo experimental, los tallos de las plantas control alcanzaron una longitud de  $6.40 \pm 0.24$  cm, los de plantas cultivadas en PEG075  $4.68 \pm 0.20$  cm y los de plantas sometidas a estrés severo  $3.84 \pm 0.15$  cm.

El sistema radicular también se vio afectado por el estrés hídrico. El crecimiento radicular fue menor en plantas estresadas que en plantas control durante todo el periodo experimental, siendo las diferencias estadísticamente significativas a los 10 ddt en las plantas cultivadas en PEG150 y a 20 ddt en las cultivadas en PEG075. La longitud de las raíces de las plantas sometidas a estrés más severo, fue un 22.91 % menor que la de las plantas control a los 10 días después de iniciado el tratamiento, un 25.85 % a los 20 días, y un 34.47 % menor al final del tratamiento, con respecto al control. Las raíces de las plantas cultivadas en medio PEG075 crecieron significativamente menos que las plantas control, pero de forma no tan acusada como la observada en plantas cultivadas en medio PEG150.

### 3.3.3. Sintomatología en plantas sometidas a estrés osmótico

Los síntomas causados por el estrés osmótico fueron deshidratación del tejido foliar y necrosis en la parte distal de la hoja, que se fue extendiendo por el limbo. Otros daños observados en las plantas sometidas a estrés fueron disminución del diámetro de la raíz y deformación de la misma, así como necrosis del ápice radicular, esta sintomatología en raíces sometidas a condiciones de estrés hídrico estuvo siempre asociada a daños en la parte aérea de la planta (Figura 3.2). Tanto el porcentaje de plantas afectadas como la severidad de los daños aumentaron a medida que progresaba el periodo de ensayo.

Para conocer con más detalle el efecto del estrés en estas plantas, se determinó el porcentaje de hojas necrosadas así como el porcentaje de hojas deshidratadas (Figura 3.2 C; Tabla 3.4). El primer síntoma fue la aparición de hojas deshidratadas en plantas cultivadas en medio PEG150, que afectó al 59.01 % de las plantas a los 10 ddt. Al final del periodo de ensayo prácticamente el 100 % de las plantas estaban afectadas. En plantas cultivadas en medio PEG075, el porcentaje de plantas con hojas deshidratadas fue del 39.70 y 56.79 %, a los 20 y 30 ddt, respectivamente.

En plantas cultivadas en PEG150, a los 10 ddt, el porcentaje de hojas que mostraban necrosis fue de un 20.99 %. Diez días después, el porcentaje de hojas necrosadas aumentó de forma significativa, alcanzado un total de 28.08 %. Al final del experimento, prácticamente todas las hojas de las plantas sometidas a un estrés severo estaban afectadas, siendo el porcentaje de hojas que no mostraban síntomas aparentes debidos al estrés hídrico fue del 3.19 %.

En plantas cultivadas en PEG075, el porcentaje de hojas que sufrieron daños fue menor, 47.80 % mostraron deshidratación y 15.12 % necrosis a los 10 ddt. En plantas cultivadas en este medio, el porcentaje de plantas con hojas deshidratadas fue prácticamente el mismo que el porcentaje de plantas que no mostraban daños aparentes después de 10 (37.07 vs 47.80 %) y 20 días (34.71 vs 39.70 %). El porcentaje de hojas necrosadas aumentó ligeramente a medida que transcurría el tiempo del experimento, 15.12, 25.60 y 26.34 % a los 10, 20 y 30 ddt, respectivamente. En plantas sometidas a estrés moderado durante 30 días, el daño foliar mayoritario fue el de hojas deshidratadas (56.79 %), mientras que en las plantas sometidas a estrés severo el porcentaje de hojas necrosadas fue mayor (59.57 %).

En la Tabla 3.4 se muestra el porcentaje de plantas que mostraron daños en el ápice caulinar como consecuencia de su exposición a condiciones de estrés hídrico (Figura 3.2 D). Un 6.86 % de las plantas mostraron este síntoma a los 10 días de cultivo en PEG150. Diez días después, este porcentaje aumentó, observándose en un 15.69 % de las plantas. Al final del periodo experimental el 48.28 % de las plantas mostraban este daño. En el caso de plantas sometidas a estrés moderado, a los 10 ddt ninguna planta mostró este daño. Sin embargo, 20 ddt se observó necrosis apical en un 6.25 % de las plantas, porcentaje que aumentó a 15.22 % después de 30 días de ensayo.

Las plantas sometidas a un estrés osmótico mostraron una reducción del grosor de la raíz respecto a las plantas control (Tabla 3.5; Figura 3.2 E).

Otro síntoma observado fue la deformación del ápice radicular (Tabla 3.5; Figura 3.2 F). A los 10 ddt, el 91.18 % de las plantas cultivadas en PEG150 mostraron esta deformación, porcentaje que aumentó a medida que transcurría el tiempo de tratamiento llegando al 98.04 % a los 30 ddt. En plantas sometidas a estrés moderado el porcentaje de plantas que mostraron este daño fue menor, aunque aumentó a medida que transcurría el tiempo de tratamiento. A los 10 días, el

20.10 % de las plantas presentaron deformación del ápice radicular, 20 días después este porcentaje aumentó hasta alcanzar un total de 48.94 %.

Los síntomas foliares que se manifiestan en brotes aislados sometidos a estrés osmótico coinciden con los representados en la Figura 3.2. El porcentaje de brotes que mostraron estos síntomas se refleja en la Tabla 3.6 y fueron de magnitud similar a los cuantificados en hojas plantas intactas.

Tabla 3.2. Efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento en plantas intactas y brotes de citrange Carrizo sometidos a estrés osmótico.

		Tiempo de tratamiento (días)					
		10		20		30	
		Parte aérea	Parte radicular	Parte aérea	Parte radicular	Parte aérea	Parte radicular
<b>Longitud de la planta</b> (cm)	Control	5.65 ± 0.13 <sup>c</sup>	8.73 ± 0.12 <sup>d</sup>	6.36 ± 0.17 <sup>c</sup>	9.44 ± 0.11 <sup>d</sup>	6.40 ± 0.24 <sup>d</sup>	10.30 ± 0.17 <sup>c</sup>
	PEG050	4.99 ± 0.11 <sup>b</sup>	8.52 ± 0.05 <sup>c</sup>	5.29 ± 0.16 <sup>b</sup>	9.17 ± 0.10 <sup>c</sup>	5.76 ± 0.20 <sup>c</sup>	9.17 ± 0.18 <sup>b</sup>
	PEG075	4.11 ± 0.15 <sup>a</sup>	8.11 ± 0.09 <sup>b</sup>	5.19 ± 0.16 <sup>b</sup>	8.17 ± 0.10 <sup>b</sup>	5.30 ± 0.20 <sup>b</sup>	9.22 ± 0.20 <sup>b</sup>
	PEG150	4.20 ± 0.12 <sup>a</sup>	6.73 ± 0.08 <sup>a</sup>	4.17 ± 0.12 <sup>a</sup>	7.00 ± 0.08 <sup>a</sup>	4.18 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.75 ± 0.10 <sup>a</sup>
<b>Longitud del brote</b> (cm)	Control	2.75 ± 0.09 <sup>c</sup>	-	4.14 ± 0.99 <sup>c</sup>	-	6.76 ± 0.86 <sup>c</sup>	-
	PEG050	1.02 ± 0.11 <sup>b</sup>	-	1.09 ± 0.10 <sup>b</sup>	-	1.22 ± 0.09 <sup>b</sup>	-
	PEG075	0.83 ± 0.09 <sup>a</sup>	-	0.82 ± 0.08 <sup>a</sup>	-	0.82 ± 0.08 <sup>a</sup>	-
	PEG100	0.80 ± 0.05 <sup>a</sup>	-	0.80 ± 0.05 <sup>a</sup>	-	0.80 ± 0.05 <sup>a</sup>	-

\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se representan medias ± error estándar de 500 mediciones independientes.

**Tabla 3.3. Evolución de daños foliares y radiculares en plantas intactas y brotes de citrange Carrizo sometidos a estrés osmótico.**

		Tiempo de tratamiento (días)					
		10		20		30	
		Parte aérea	Parte radicular	Parte aérea	Parte radicular	Parte aérea	Parte radicular
<b>Plantas afectadas</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	PEG050	10.81 ± 0.11 <sup>b</sup>	2.26 ± 0.06 <sup>b</sup>	23.20 ± 0.09 <sup>b</sup>	3.10 ± 0.02 <sup>b</sup>	31.52 ± 1.01 <sup>b</sup>	10.05 ± 0.01 <sup>b</sup>
	PEG075	40.84 ± 0.08 <sup>c</sup>	16.67 ± 0.04 <sup>c</sup>	49.39 ± 0.07 <sup>c</sup>	38.05 ± 0.54 <sup>c</sup>	76.07 ± 0.05 <sup>c</sup>	81.55 ± 0.42 <sup>c</sup>
	PEG100	42.33 ± 0.08 <sup>c</sup>	40.94 ± 0.21 <sup>d</sup>	51.53 ± 0.66 <sup>c</sup>	42.25 ± 0.67 <sup>d</sup>	79.01 ± 0.08 <sup>c</sup>	83.05 ± 0.66 <sup>c</sup>
	PEG150	61.02 ± 0.12 <sup>d</sup>	65.47 ± 0.15 <sup>e</sup>	76.11 ± 0.20 <sup>d</sup>	76.61 ± 0.15 <sup>e</sup>	93.56 ± 0.08 <sup>d</sup>	92.65 ± 0.23 <sup>d</sup>
<b>Brotos afectados</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	–	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	–	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	–
	PEG050	78.99 ± 0.28 <sup>b</sup>	–	84.51 ± 0.50 <sup>b</sup>	–	91.25 ± 0.14 <sup>b</sup>	–
	PEG075	94.89 ± 0.25 <sup>c</sup>	–	97.52 ± 0.11 <sup>c</sup>	–	99.18 ± 0.15 <sup>c</sup>	–
	PEG100	100.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	–	100.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	–	100.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	–

\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se representan medias ± error estándar de 500 mediciones independientes.

Tabla 3.4. Sintomatología en hojas de plantas de citrango Carrizo sometidas a estrés osmótico.

		Tiempo de tratamiento (días)		
		10	20	30
<b>Hojas sin daños aparentes</b> (%)	Control	100.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
	PEG075	37.07 ± 0.15 <sup>b</sup>	37.71 ± 0.11 <sup>b</sup>	16.87 ± 0.15 <sup>b</sup>
	PEG150	20.00 ± 0.09 <sup>a</sup>	8.13 ± 0.18 <sup>a</sup>	3.19 ± 0.10 <sup>a</sup>
<b>Hojas deshidratadas</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	PEG075	47.80 ± 0.08 <sup>b</sup>	39.70 ± 1.00 <sup>b</sup>	56.79 ± 0.35 <sup>c</sup>
	PEG150	59.01 ± 0.07 <sup>c</sup>	63.79 ± 0.25 <sup>c</sup>	37.23 ± 0.20 <sup>b</sup>
<b>Hojas necrosadas</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	PEG075	15.12 ± 0.58 <sup>b</sup>	26.34 ± 0.21 <sup>b</sup>	15.22 ± 0.11 <sup>b</sup>
	PEG150	20.99 ± 0.18 <sup>c</sup>	59.57 ± 0.13 <sup>c</sup>	48.28 ± 0.13 <sup>c</sup>
<b>Ápice necrosado</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	PEG075	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	6.25 ± 0.01 <sup>b</sup>	15.22 ± 0.10 <sup>b</sup>
	PEG150	6.86 ± 0.02 <sup>b</sup>	15.69 ± 0.13 <sup>c</sup>	48.28 ± 0.08 <sup>c</sup>

\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se representan medias ± error estándar de 500 mediciones independientes.

**Tabla 3.5. Sintomatología en raíces de plantas de citrange Carrizo sometidas a estrés osmótico.**

		Tiempo de tratamiento (días)		
		10	20	30
<b>Raíces deformadas</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	PEG075	20.10 ± 0.21 <sup>b</sup>	48.94 ± 0.06 <sup>b</sup>	61.05 ± 0.18 <sup>b</sup>
	PEG150	91.18 ± 0.59 <sup>c</sup>	92.45 ± 0.38 <sup>c</sup>	98.04 ± 0.20 <sup>c</sup>
<b>Raíces necrosadas</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	PEG075	16.67 ± 0.20 <sup>b</sup>	16.67 ± 0.20 <sup>b</sup>	16.68 ± 0.32 <sup>b</sup>
	PEG150	59.01 ± 0.07 <sup>c</sup>	63.79 ± 0.25 <sup>c</sup>	37.23 ± 0.20 <sup>c</sup>
<b>Raíces más estrechas</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	PEG075	4.05 ± 0.15 <sup>b</sup>	28.25 ± 0.11 <sup>b</sup>	35.65 ± 0.11 <sup>b</sup>
	PEG150	15.06 ± 0.12 <sup>c</sup>	79.67 ± 0.11 <sup>c</sup>	88.75 ± 0.13 <sup>c</sup>

\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se representan medias ± error estándar de 500 mediciones independientes.

Tabla 3.6. Sintomatología brotes aislados de citrange Carrizo sometidos a estrés osmótico.

		Tiempo de tratamiento (días)		
		10	20	30
<b>Hojas sin daños aparentes</b> (%)	Control	100.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
	PEG050	27.07 ± 0.15 <sup>b</sup>	20.26 ± 0.06 <sup>b</sup>	6.56 ± 0.14 <sup>b</sup>
	PEG075	18.00 ± 0.09 <sup>a</sup>	16.65 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.05 ± 0.18 <sup>a</sup>
<b>Hojas deshidratadas</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	PEG050	37.71 ± 0.08 <sup>b</sup>	33.15 ± 0.26 <sup>c</sup>	27.55 ± 0.26 <sup>c</sup>
	PEG075	38.89 ± 0.19 <sup>c</sup>	23.48 ± 0.58 <sup>b</sup>	9.20 ± 0.33 <sup>b</sup>
<b>Hojas necrosadas</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	PEG050	35.22 ± 0.55 <sup>b</sup>	46.59 ± 0.19 <sup>b</sup>	65.89 ± 0.19 <sup>b</sup>
	PEG075	42.14 ± 0.17 <sup>c</sup>	59.87 ± 0.14 <sup>c</sup>	88.75 ± 0.11 <sup>c</sup>
<b>Ápice necrosado</b> (%)	Control	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	PEG050	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	2.61 ± 0.08 <sup>b</sup>
	PEG075	0.04 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.13 <sup>b</sup>	3.86 ± 0.07 <sup>c</sup>

\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se representan medias ± error estándar de 500 mediciones independientes.



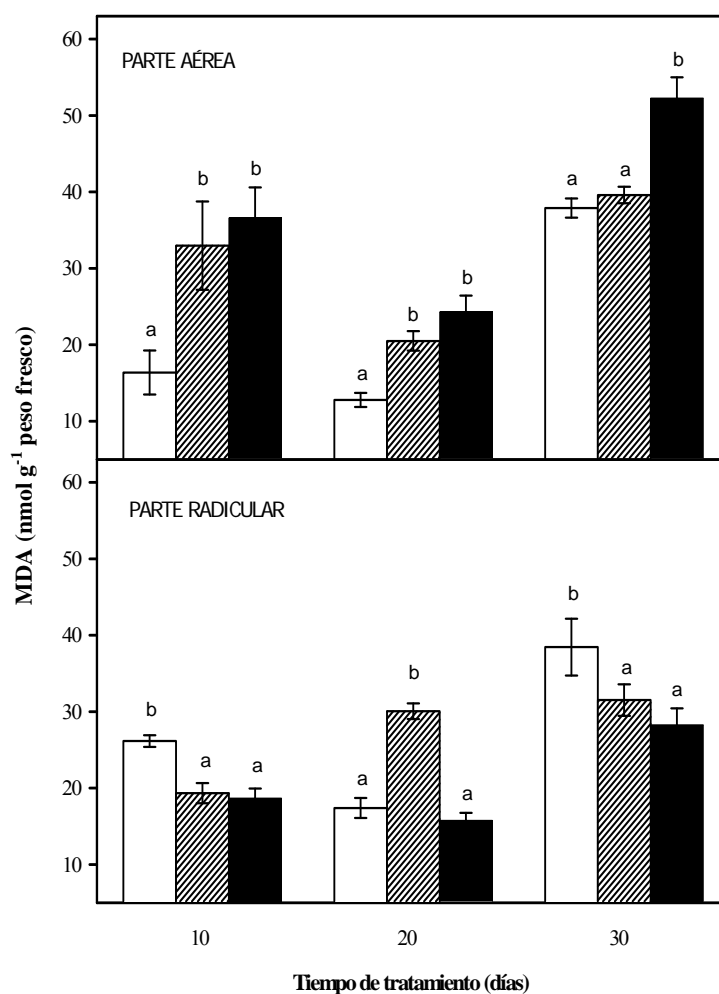


**Figura 3.2. Sintomatología foliar y radicular del estrés osmótico en plantas intactas y brotes aislados de citrange Carrizo.** (A) Plantas control (izquierda), plantas cultivadas en medio PEG075 (centro), plantas cultivadas en medio PEG150 (derecha). (B) Evolución de los daños foliares en brotes a 0, 10, 20 y 30 ddt. (C) Evolución de los daños en hoja a 0, 10, 20 y 30 ddt. (D) Ápice foliar dañado. (E) Sistema radicular después de 30 días de tratamiento en plantas control (izquierda), plantas cultivadas en medio PEG075 (centro) y plantas cultivadas en medio PEG150 (derecha). (F) Deformación y necrosis del extremo apical de plantas sometidas a estrés osmótico después de 10 (izquierda), 20 (centro) y 30 (derecha) días de tratamiento.

### 3.3.4. Efecto del estrés osmótico en plantas intactas de CC cultivadas *in vitro*

#### 3.3.4.1. Estrés oxidativo

El grado de daño oxidativo provocado por el estrés osmótico en plantas de CC cultivadas *in vitro*, se estimó cuantificando la concentración de MDA en las hojas (Figura 3.3, panel superior) y las raíces (Figura 3.3, panel inferior) de estas plantas después de 10, 20 y 30 días de estrés.



**Figura 3.3.** Concentración de malondialdehído (MDA) en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*. Plantas control (□), plantas tratadas con PEG075 (▨) y plantas tratadas con PEG150 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

En plantas cultivadas en los medios suplementados con PEG-6000 se determinaron concentraciones foliares de MDA similares, con independencia de la concentración de PEG-6000 utilizada, que fueron mayores a los valores obtenidos en plantas control tras 10 y 20 días

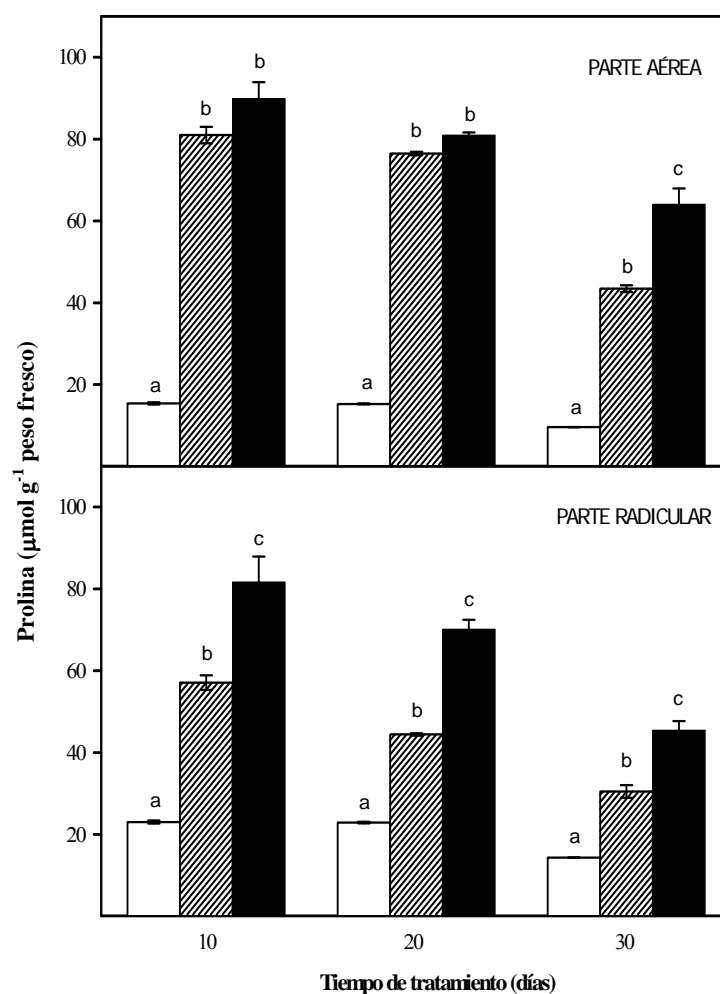
de tratamiento. Estas diferencias fueron más acusadas a los 10 ddt, alcanzando las plantas estresadas valores de MDA 1.38 veces mayores que las plantas control. Después de 30 días de estrés, los niveles de MDA foliar de plantas sometidas al estrés severo fueron 1.38 veces superiores a los encontrados en plantas control ( $37.89 \pm 1.27 \text{ nmol g}^{-1}$ ). Las hojas de plantas cultivadas en PEG075 presentaron, al final del experimento, concentraciones de MDA ligeramente superiores a las determinadas en las plantas control y significativamente menores a las obtenidas en tejido foliar de plantas sometidas a estrés severo.

El patrón de acumulación de MDA en la parte radicular fue diferente al observado en la parte aérea después de 10, 20 y 30 días de estrés osmótico. Al inicio del experimento, las plantas sometidas a estrés (independientemente de la concentración de PEG-6000 utilizada en el medio de cultivo), contenían concentraciones de MDA un 28.53 % menores que las encontradas en plantas control. A los 20 ddt, se observó un incremento significativo de los niveles de MDA en las raíces de plantas sometidas a estrés moderado, determinándose concentraciones de MDA 1.76 veces mayores a las obtenidas en plantas control. De forma similar a lo observado al inicio del tratamiento, a los 30 ddt, los niveles de MDA en raíces de plantas control fueron superiores a los determinados en raíces de plantas sometidas a estrés.

Aunque únicamente a los 20 días de iniciado el ensayo las diferencias fueron estadísticamente significativas, las raíces de plantas sometidas a estrés severo mostraron, a lo largo de todo el periodo experimental, concentraciones de MDA menores a las determinadas en plantas sometidas a estrés moderado.

#### **3.3.4.2. Concentración de prolina**

Como se muestra en la Figura 3.4, se produjo una rápida acumulación de prolina en plantas estresadas, tanto en la parte aérea (panel superior) como en el sistema radicular (panel inferior). Durante todo el periodo experimental se determinaron concentraciones de este osmolito mayores en plantas estresadas que en plantas control, con independencia del material vegetal considerado. A los 10 ddt, las hojas de las plantas cultivadas en los medios PEG075 y PEG150 mostraron concentraciones 5.25 y 5.83 veces superiores a las medidas en hojas de plantas control. Después de 10 y 20 días de estrés, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de prolina entre brotes de plantas sometidas a estrés moderado y los sometidos a estrés severo. Al final del periodo experimental, el contenido en prolina en hojas de plantas cultivadas en medio PEG150 fue superior al medido en hojas de plantas cultivadas en PEG075, siendo las diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 3.4. Concentración de prolina en plantas de citrango Carrizo cultivadas *in vitro*.** Plantas control (□), plantas tratadas con PEG075 (▨) y plantas tratadas con PEG150 (■). Cada punto corresponde a la media de 4 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Se determinó también el contenido de prolina en la parte radicular de plantas sometidas a estrés después de 10, 20 y 30 días de tratamiento (Figura 3.4, panel inferior). Como se observa en la figura, a lo largo de todo el periodo experimental las diferencias en el contenido en prolina fueron estadísticamente significativas, tanto entre los tratamientos de estrés como con los valores determinados para plantas control. Las raíces de plantas control mostraron en todas las determinaciones concentraciones basales de este osmolito, las de plantas sometidas a un estrés moderado presentaron concentraciones intermedias y las de plantas sometidas a estrés severo mostraron los valores más elevados. Aunque la pauta de acumulación de prolina se mantuvo en el tiempo, los valores medidos para cada uno de los tratamientos se fueron reduciendo

progresivamente, así, en el caso de plantas cultivadas en medio PEG150, tras 10 días de estrés, el contenido de prolina en raíces fue de  $81.68 \pm 6.20 \mu\text{mol g}^{-1}$ , mientras que a los 30 ddt las raíces contenían  $45.47 \pm 2.21 \mu\text{mol g}^{-1}$ . Esta reducción también se observó en raíces de plantas cultivadas en medio PEG075, que pasaron de acumular  $57.08 \pm 1.77 \mu\text{mol g}^{-1}$  a los 10 días a  $30.49 \pm 1.54 \mu\text{mol g}^{-1}$  a los 30 ddt.

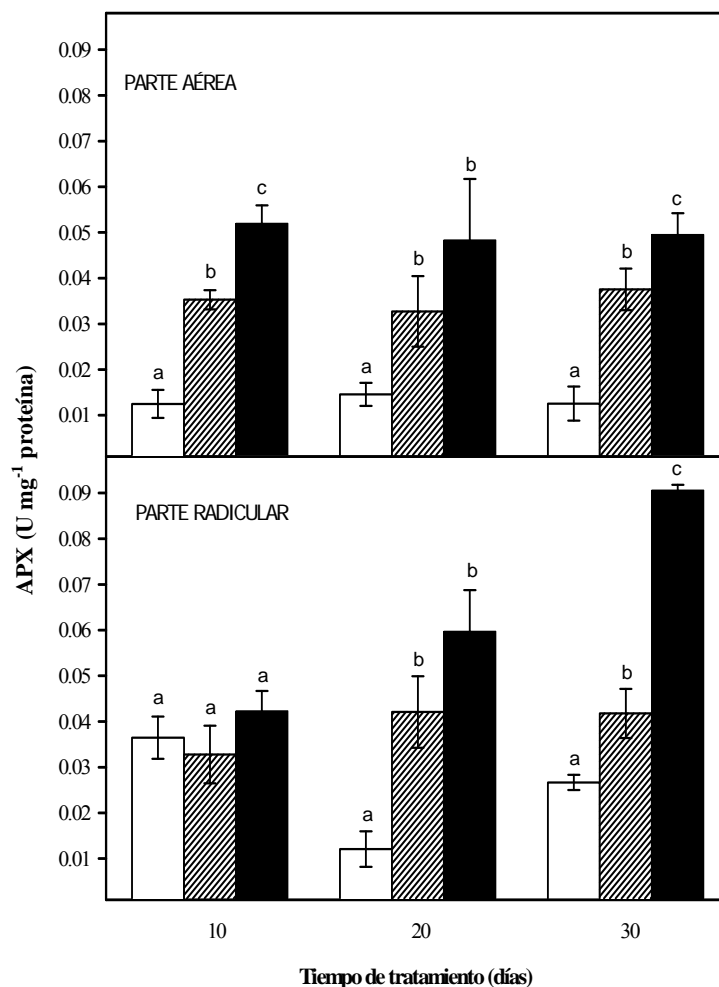
### 3.3.4.3. Actividad de los enzimas antioxidantes

#### 3.3.4.3.1. APX

En la Figura 3.5 se representa la actividad del enzima APX en la parte aérea y radicular de plantas de CC cultivadas *in vitro*.

Como se observa en la figura, la actividad APX se incrementó tanto en las plantas sometidas a estrés osmótico moderado como severo. Las plantas cultivadas en medio PEG075 experimentaron un rápido incremento de esta actividad enzimática en la parte aérea (Figura 3.5, panel superior). A los 10 días de tratamiento, los valores fueron 2.81 veces superiores a los registrados en plantas control. Estos valores se mantuvieron constantes mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto a las plantas control durante todo el ensayo. La actividad APX en plantas sometidas al estrés severo fue mayor a la determinada para plantas sometidas a estrés moderado durante todo el periodo experimental, siendo las diferencias estadísticamente significativas.

En el sistema radicular (Figura 3.5, panel inferior) el estrés osmótico tuvo un efecto similar en la actividad del enzima APX al que se registró en la parte aérea. En este caso, el incremento de la actividad APX fue un poco más tardío que en la parte aérea. No se observaron diferencias en la actividad de este enzima entre plantas control y estresadas a los 10 días de iniciado el ensayo. Sin embargo, a los 20 ddt se observó un incremento muy acusado de los valores registrados para la actividad APX en plantas sometidas a estrés (3.48 y 4.94 veces superiores al control en plantas cultivadas en PEG075 y PEG150). La actividad de este enzima, en plantas cultivadas en PEG150, aumentó de forma progresiva y a los 30 días alcanzó un punto máximo 3.40 veces superior al control. Este aumento no fue tan acusado en plantas cultivadas en medio PEG075 (1.56 veces superior al control). Aunque los valores de actividad enzimática en plantas estresadas fueron siempre mayores en aquellas sometidas a estrés severo, únicamente al final del periodo experimental estas diferencias fueron estadísticamente significativas.



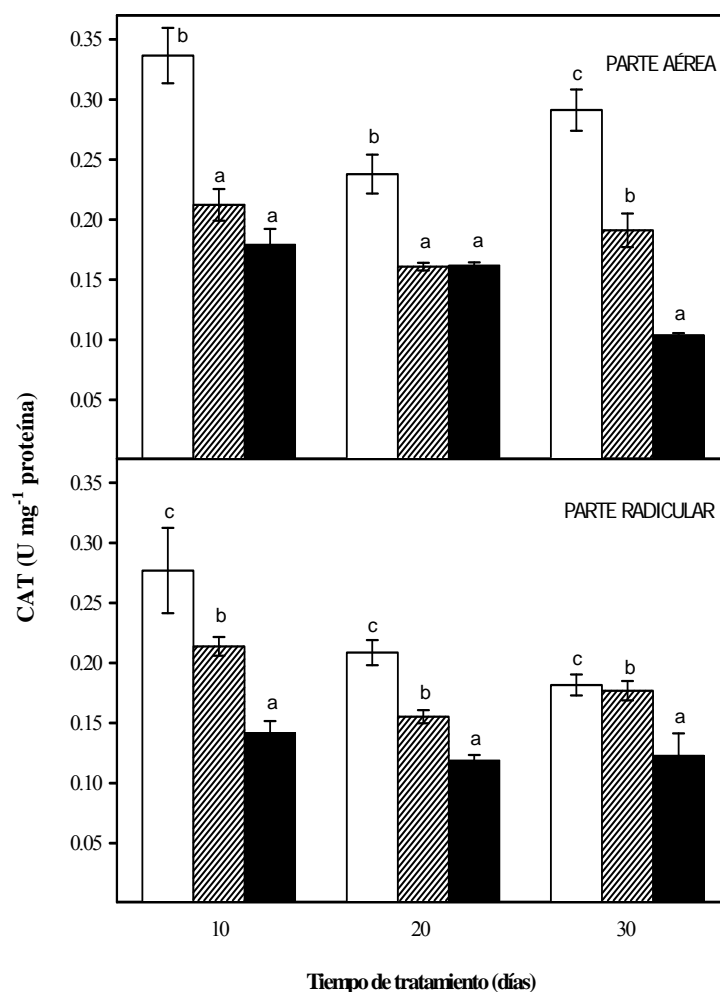
**Figura 3.5.** Actividad del enzima ascorbato peroxidasa (APX) en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*. Plantas control (□), plantas tratadas con PEG075 (▨) y plantas tratadas con PEG150 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3.4.3.2. CAT

En la Figura 3.6 se representan los valores obtenidos para la actividad CAT en plantas sometidas a estrés osmótico, tanto en la parte aérea de la planta (panel superior) como en la radicular (panel inferior). En todos los tratamientos, se produjo una disminución de esta actividad enzimática en respuesta al tratamiento de estrés, con independencia de la severidad del mismo.

En los brotes de las plantas control se determinaron valores para esta actividad enzimática significativamente superiores a los observados en brotes de plantas sometidas a estrés durante todo el periodo experimental. Aunque las plantas sometidas a estrés moderado presentaron

valores mayores a los registrados en el caso de plantas sometidas a estrés severo durante todo el periodo experimental, las diferencias únicamente tuvieron significación estadística al final del ensayo.



**Figura 3.6. Actividad del enzima catalasa (CAT) en plantas de cítrange Carrizo cultivadas *in vitro*.** Plantas control (□), plantas tratadas con PEG075 (▨) y plantas tratadas con PEG150 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

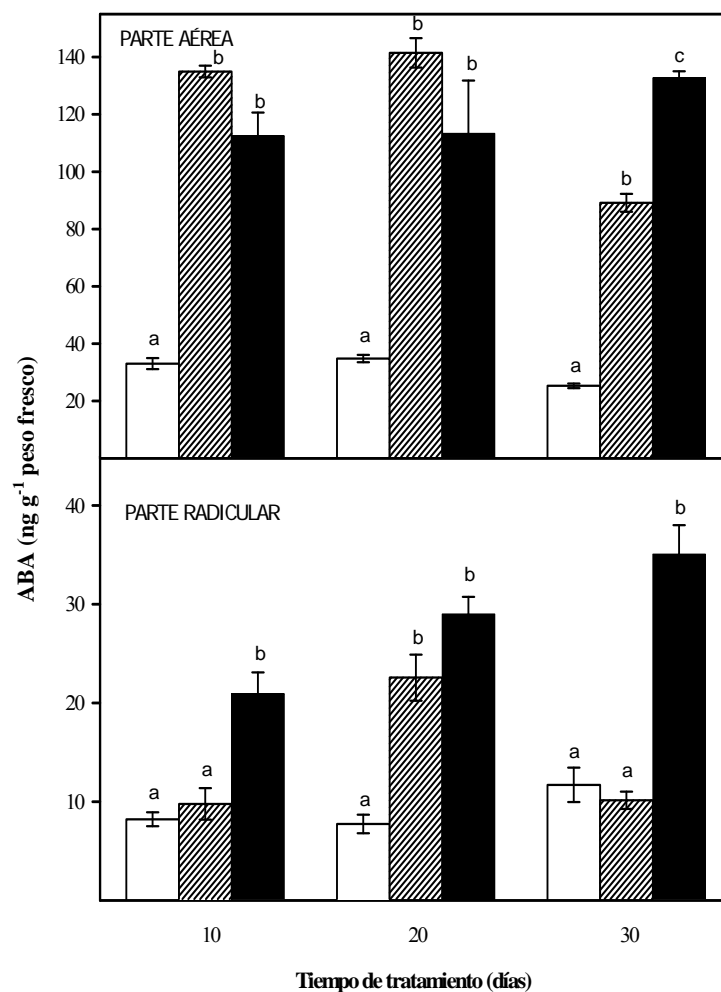
De la misma forma, se produjo una reducción de la actividad del enzima CAT en la parte radicular de plantas estresadas con respecto al control (panel inferior), existiendo diferencias significativas entre tratamientos desde el inicio del ensayo. El mayor descenso de la actividad enzimática se observó a los 10 ddt en las plantas sometidas al estrés más severo, siendo su actividad un 53.34 % menor que en plantas cultivadas en condiciones de estrés moderado. Al final del experimento, las plantas cultivadas en PEG150 mostraron una menor actividad del enzima ( $0.12 \pm 0.01$  U  $\text{mg}^{-1}$  proteína), mientras que las plantas estresadas con la dosis moderada

de PEG registraron valores similares a los obtenidos en plantas control ( $0.18 \pm 0.01 \text{ U mg}^{-1}$  proteína).

### 3.3.4.4. Concentración de fitohormonas

#### 3.3.4.4.1. ABA

El contenido de ABA en plantas de CC sometidas a estrés osmótico se representa en la Figura 3.7. Durante todo el periodo experimental, se observó que las plantas acumulaban mayor cantidad de esta hormona en la parte aérea que en las raíces.



**Figura 3.7. Concentración de ácido abscísico (ABA) en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*.** Plantas control (□), plantas tratadas con PEG075 (▨) y plantas tratadas con PEG150 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



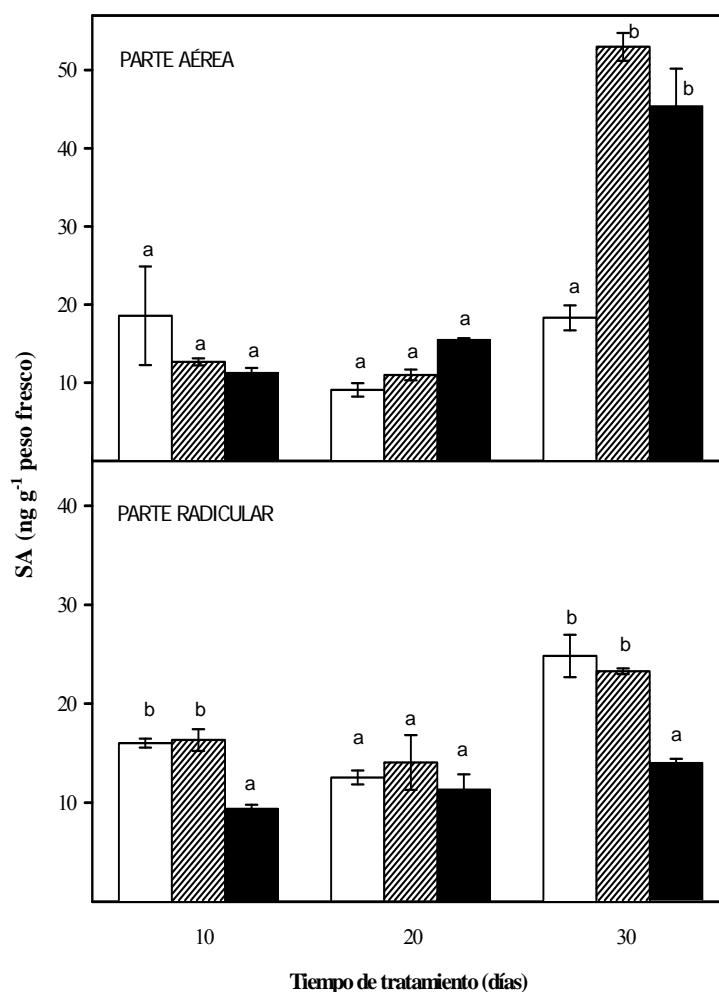
Las plantas sometidas a estrés presentaron concentraciones foliares de ABA superiores a las observadas en hojas de plantas control. Durante el tiempo que duró el ensayo, la concentración de esta hormonas en plantas control se mantuvo en valores cercanos a  $34.84 \text{ ng g}^{-1}$ . Después de 10 y 20 días de tratamiento de estrés, las hojas de plantas sometidas a estrés moderado presentaron elevadas concentraciones de ABA,  $134.96 \pm 2.06$  y  $141.46 \pm 5.11 \text{ ng g}^{-1}$  respectivamente, mientras que en aquellas sometidas a estrés severo, la concentración de ABA fue  $112.52 \pm 8.11$  y  $113.35 \pm 8.43 \text{ ng g}^{-1}$ . Esta situación se invirtió al final del ensayo, mostrando las plantas cultivadas en PEG150 concentraciones de ABA superiores a las cultivadas en PEG075.

Las raíces de las plantas sometidas al estrés osmótico más severo mostraron una mayor concentración de ABA que las plantas control y que las plantas sometidas a estrés moderado, durante todo el ensayo (panel inferior). Al inicio del experimento (10 ddt) las raíces de plantas cultivadas en PEG075 mostraron contenidos de ABA muy similares a los determinados en plantas control ( $8.21 \pm 0.71$  vs  $9.77 \pm 1.59 \text{ ng g}^{-1}$ ), situación que se repitió a los 30 ddt. A mitad del periodo experimental (20 ddt) se registró un pico en la concentración de esta hormona en raíces de plantas sometidas a estrés moderado, llegando a valores similares a los obtenidos en plantas sometidas a estrés severo. En este punto, se observaron diferencias estadísticamente significativas en ambos tratamientos frente al control.

#### 3.3.4.4.2. SA

La evolución del contenido de SA se representa en la Figura 3.8. Durante gran parte del periodo experimental, el contenido de SA en brotes de plantas sometidas a estrés osmótico no varió con respecto a los valores registrados para plantas control. A los 30 días de iniciado el experimento, se observó un incremento en el contenido de esta hormona en plantas sometidas a estrés (2.89 y 2.48 veces superior a los valores control en plantas cultivadas en los medios PEG075 y PEG150, respectivamente).

Los valores en el contenido de esta hormona en raíces de plantas control y plantas sometidas a estrés moderado fueron similares (panel inferior). Las raíces de plantas sometidas a estrés severo mostraron en todas las determinaciones concentraciones de SA menores que las encontradas en raíces de plantas control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas a los 10 y 30 ddt.

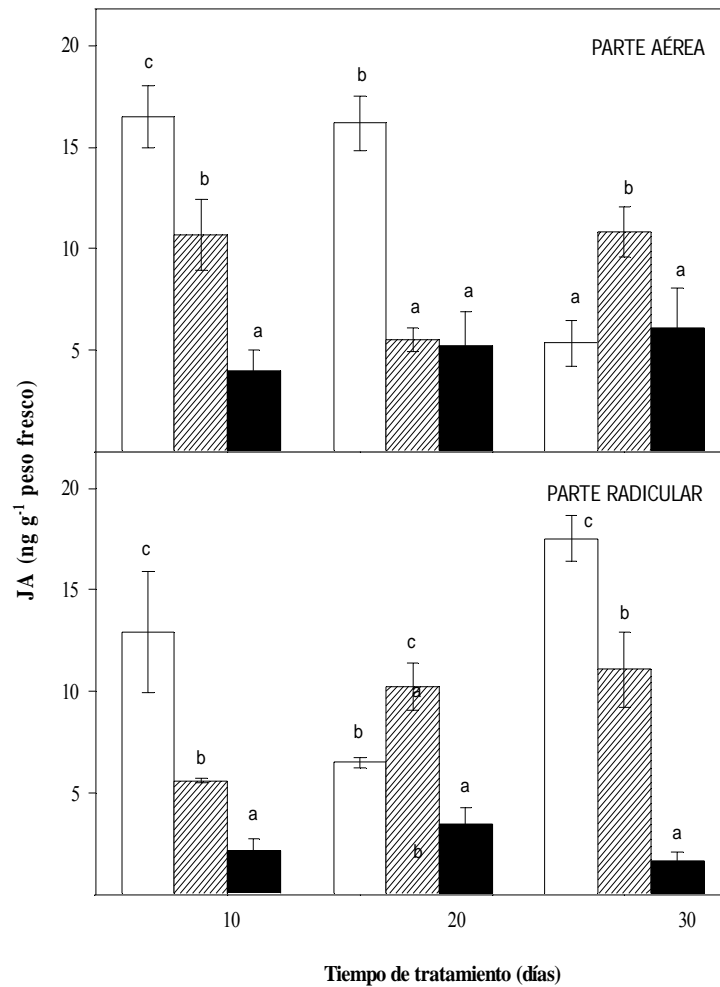


**Figura 3.8. Concentración de ácido salicílico (SA) en plantas de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*.** Plantas control (□), plantas tratadas con PEG075 (▨) y plantas tratadas con PEG150 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3.4.4.3. JA

En la Figura 3.9 se representa el contenido de JA en plantas sometidas a estrés osmótico. Como se observa en el panel superior de la figura, a los 10 días después de iniciado el tratamiento, las plantas control presentaban un contenido de JA en la parte foliar significativamente mayor que el registrado en plantas sometidas a estrés moderado y severo. Diez días después, se observó una ligera disminución en el contenido de esta hormona en plantas control ( $16.19 \pm 1.34 \text{ ng g}^{-1}$ ), aunque siguió siendo significativamente mayor al determinado en plantas sometidas a estrés, que presentaron valores similares con independencia de la severidad del mismo. Al final del experimento, los niveles de JA en plantas control fueron similares a los determinados en plantas cultivadas en PEG150, y menores a los determinados en plantas cultivadas en PEG075.

Por otra parte, el contenido de esta hormona en raíces de plantas control, 10 y 30 días después de iniciado el tratamiento, fue significativamente mayor que el obtenido en plantas cultivadas en medio suplementado con PEG-6000 (Figura 3.9, panel inferior). Durante todo el periodo experimental, las raíces de plantas sometidas a estrés severo presentaron concentraciones de JA menores a las determinadas en raíces de plantas sometidas a estrés moderado, siendo las diferencias estadísticamente significativas.

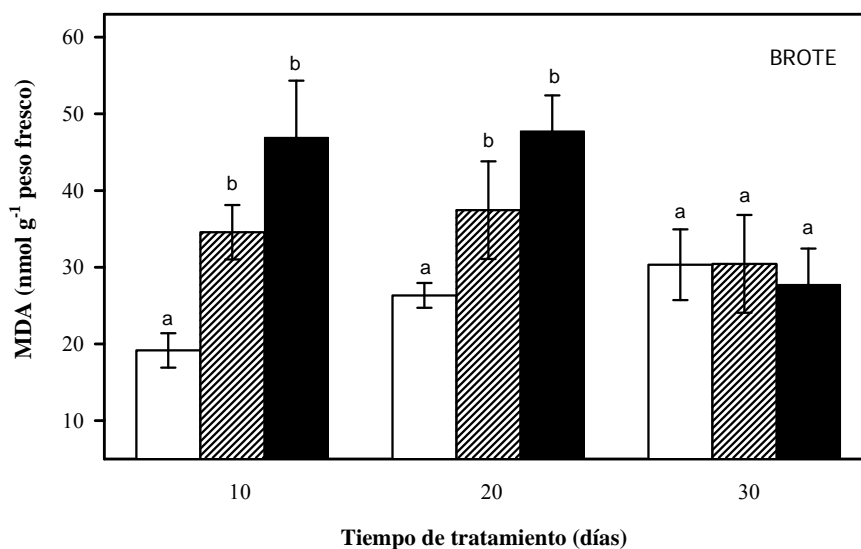


**Figura 3.9. Concentración de ácido jasmónico (JA) en plantas de citrango Carrizo cultivadas *in vitro*.** Plantas control (□), plantas tratadas con PEG075 (▨) y plantas tratadas con PEG150 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3.5. Efecto del estrés osmótico en brotes aislados de CC cultivados *in vitro*

#### 3.3.5.1. Estrés oxidativo

En la Figura 3.10 se representa el contenido de MDA en brotes aislados de CC cultivados en medio PEG050, PEG075 y control después de 10, 20 y 30 días de iniciado el ensayo. El estrés osmótico provocó un aumento del contenido de MDA al inicio del tratamiento. Los niveles de MDA en brotes estresados fueron más elevados que los determinados en brotes control a los 10 y 20 ddt. Durante este periodo los brotes sometidos a estrés severo mostraron mayores concentraciones de MDA que los sometidos a estrés moderado (ej.  $46.01 \pm 13.36$  vs  $55.22 \pm 10.62$  nmol g<sup>-1</sup> a los 10 ddt), aunque las diferencias no fueron significativas estadísticamente. Al final del periodo experimental, los niveles de MDA en brotes sometidos a estrés (tanto moderado como severo) fueron similares a los obtenidos en plantas control y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

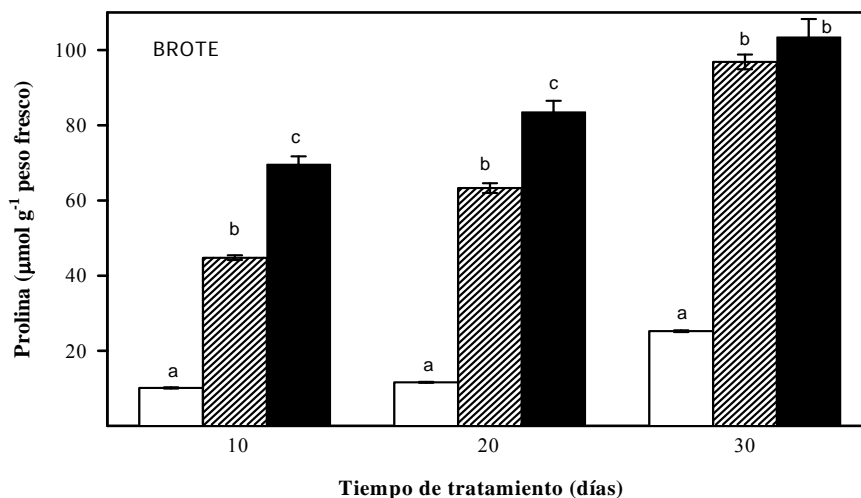


**Figura 3.10.** Concentración de malondialdehído (MDA) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*. Brotes control (□), brotes tratados con PEG050 (▨) y brotes tratados con PEG075 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### 3.3.5.2. Concentración de prolina

El contenido de prolina en brotes sometidos a estrés osmótico se representa en la Figura 3.11. En los brotes cultivados en medio suplementado con PEG-6000, la acumulación de prolina se produjo de forma progresiva, mostrando valores superiores a los observados en brotes control a lo largo de todo el periodo experimental. Las diferencias con respecto al control mostraron significación estadística a los 10, 20 y 30 ddt. Después de 10 días de tratamiento el contenido de

este osmolito, en brotes cultivados en medio PEG050, fue 4.40 veces superior al determinado en los brotes control, mientras que en aquellos sometidos al estrés más severo se registraron valores 6.86 veces superiores al control.

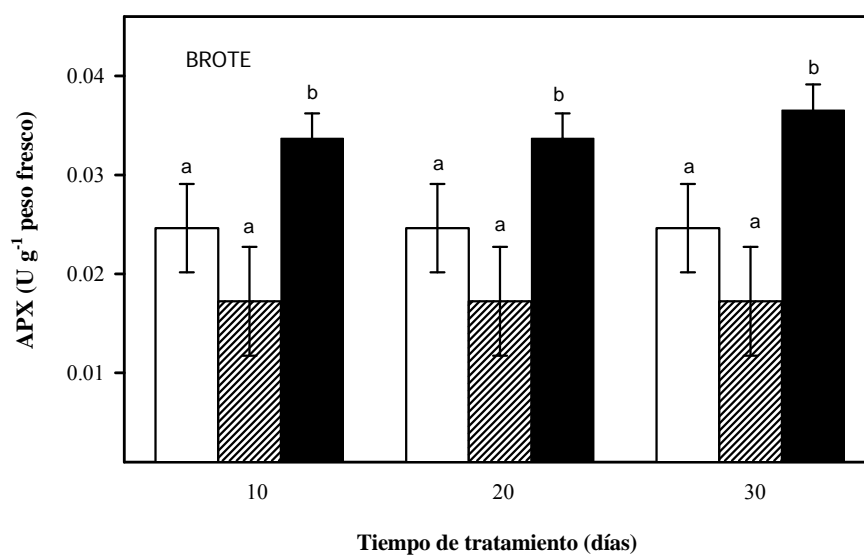


**Figura 3.11. Concentración de prolina en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.** Brotes control (□), brotes tratados con PEG050 (▨) y brotes tratados con PEG075 (■). Cada punto corresponde a la media de 4 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

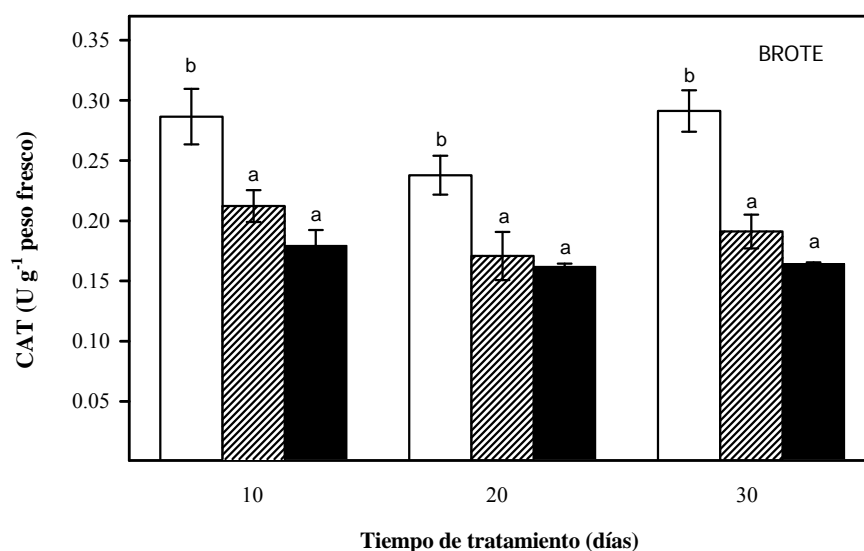
### 3.3.5.3. Actividad de los enzimas antioxidantes

#### 3.3.5.3.1. APX

La influencia que ejerció el estrés osmótico sobre la actividad APX en brotes de citrange Carrizo fue similar a los 10, 20 y 30 ddt (Figura 3.12). Así, los brotes cultivados en medios con la dosis menor de PEG-6000 mostraron valores de actividad APX similares a los obtenidos en brotes control. Sin embargo, la actividad APX en los brotes sometidos a estrés más severo fue mayor a la registrada en brotes control durante todo el periodo experimental y llegó a alcanzar incrementos del 50.00 % a los 30 ddt. Durante los 30 días que duró el ensayo, las diferencias en la actividad APX entre brotes sometidos a estrés severo y los sometidos a estrés moderado fueron estadísticamente significativas. Por el contrario, las diferencias en la actividad de APX determinadas entre brotes sometidos a estrés moderado y control no tuvieron en ningún momento significación estadística.



**Figura 3.12.** Actividad del enzima ascorbato peroxidasa (APX) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*. Brotes control (□), brotes tratados con PEG050 (▨) y brotes tratados con PEG075 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 3.13.** Actividad del enzima catalasa (CAT) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*. Brotes control (□), brotes tratados con PEG050 (▨) y brotes tratados con PEG075 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3.5.3.2. CAT

En la Figura 3.13 se representan los valores de la actividad CAT a los 10, 20 y 30 ddt en brotes de citrange Carrizo sometidos a diferentes condiciones de estrés osmótico. En los brotes sometidos a estrés se produjo una disminución de la actividad enzimática respecto a las plantas control desde el inicio de tratamiento. A los 10 días, se registraron valores de  $0.28 \pm 0.02$  U  $\text{mg}^{-1}$  en brotes control mientras que en las plantas sometidas a estrés moderado y severo, fueron menores,  $0.18 \pm 0.01$  y  $0.21 \pm 0.01$  U  $\text{mg}^{-1}$ , respectivamente. Durante todo el experimento la actividad enzimática de los tres grupos de plantas estudiados permaneció en valores similares a los registrados a los 10 ddt.

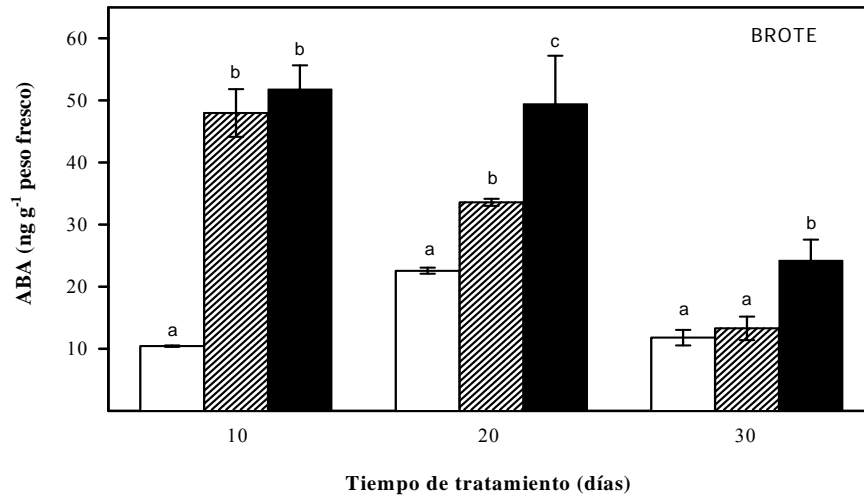
### 3.3.5.4. Concentración de fitohormonas

#### 3.3.5.4.1. ABA

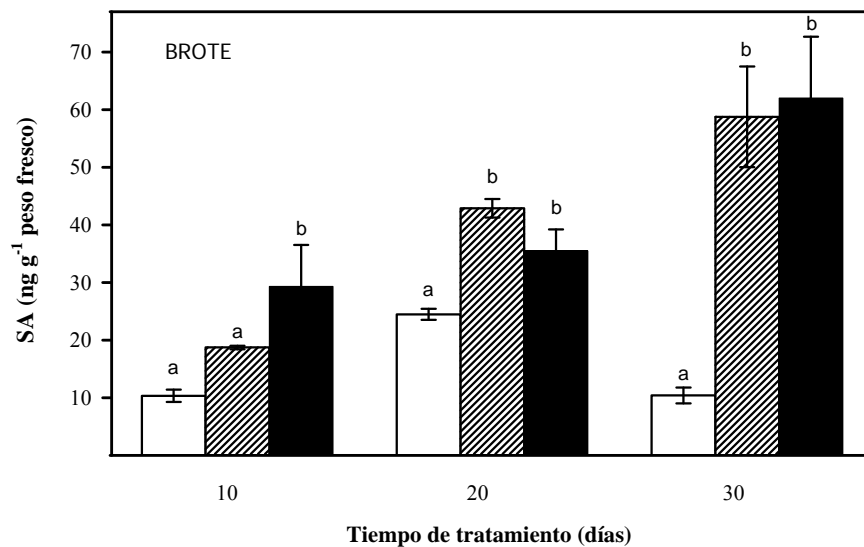
En la Figura 3.14 se representa la evolución en el contenido de ABA en brotes sometidos a estrés osmótico. La adición de PEG-6000 al medio de cultivo provocó un aumento de la concentración de esta hormona. En los brotes sometidos a estrés se determinaron concentraciones superiores a los determinados en brotes control durante todo el periodo experimental. A los 10 ddt, los brotes sometidos a estrés moderado y severo contenían 4.60 y 4.97 veces más de ABA que los brotes control, respectivamente. Diez días después, el contenido de ABA en brotes sometidos a estrés severo fue superior al observado en aquellos sometidos a estrés moderado, siendo las diferencias encontradas estadísticamente significativas. Al final del ensayo, los niveles de ABA determinados en brotes cultivados en PEG050 fueron muy similares a los observados en brotes control, mientras que los cultivados en PEG075 mostraron valores mayores.

#### 3.3.5.4.2. SA

Como se refleja en la Figura 3.15, el estrés osmótico provocó un aumento en los niveles endógenos de SA en brotes cultivados en medio suplementado con PEG-6000. A los 10 ddt los brotes sometidos a estrés severo contenían 2.80 veces más SA que los controles, mientras que los sometidos a estrés moderado presentaron concentraciones de esta hormona ligeramente superiores a los valores control. A los 20 ddt, en brotes cultivados en medio PEG050, se produjo un incremento significativo en la concentración de SA, alcanzando valores 1.75 veces superiores al control. Al final de experimento, se observó un aumento acusado en los niveles de esta hormona en brotes sometidos a estrés, siendo los valores registrados 5.65 y 5.96 veces superiores a los valores control, en plantas sometidas a estrés moderado y severo, respectivamente.



**Figura 3.14. Concentración de ácido abscísico (ABA) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.** Brotes control (□), brotes tratados con PEG050 (▨) y brotes tratados con PEG075 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

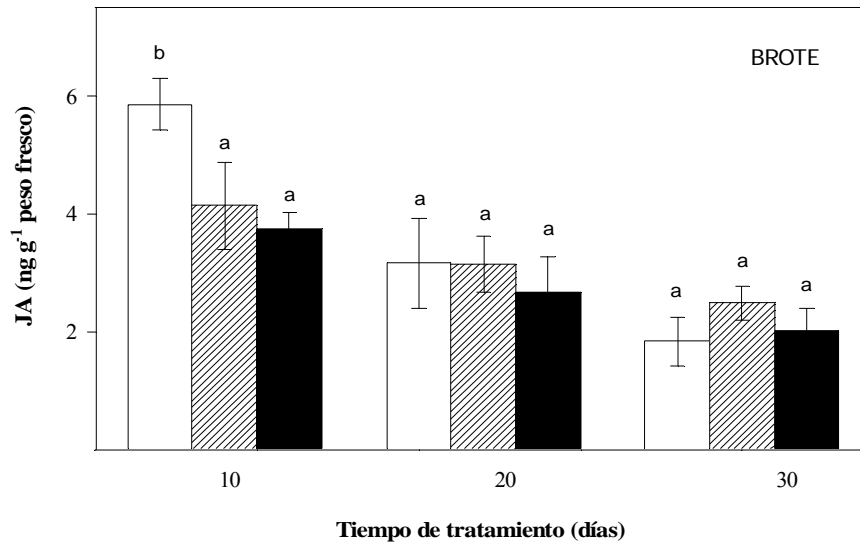


**Figura 3.15. Concentración de ácido salicílico (SA) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.** Brotes control (□), brotes tratados con PEG050 (▨) y brotes tratados con PEG075 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



### 3.3.5.4.3. JA

En la Figura 3.16 se representa la concentración de JA en brotes sometidos a estrés osmótico a los 10, 20 y 30 ddt. Diez días después de iniciado el tratamiento se observó un descenso de JA endógeno en plantas estresadas con respecto al obtenido en plantas control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos después de 20 y 30 días de tratamiento.



**Figura 3.16. Concentración de ácido jasmónico (JA) en brotes de citrange Carrizo cultivados *in vitro*.** Brotes control (□), brotes tratados con PEG050 (▨) y brotes tratados con PEG075 (■). Cada punto corresponde a la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.4. DISCUSIÓN

Como se describe en la Introducción General de esta Memoria, la expresión cultivo *in vitro* de plantas, hace referencia al cultivo de plantas, o fragmentos de éstas, en recipientes de cultivo en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia y el control preciso de los factores que afectan al crecimiento y desarrollo de las mismas.

Actualmente, mediante la utilización de la tecnología de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es posible reproducir, en condiciones de laboratorio, todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que abre nuevas posibilidades para el estudio de procesos que no es posible abordar en plantas cultivadas en campo o en invernadero (Pérez-Clemente y cols., 2006). Así pues, el cultivo de tejidos vegetales no se limita a la multiplicación y mejora genética, mediante aproximaciones biotecnológicas de plantas de interés agronómico, a la conservación de recursos fitogenéticos, al saneamiento del material vegetal o a la producción a gran escala de metabolitos secundarios sino que permite llevar a cabo estudios fisiológicos, bioquímicos, morfogenéticos y anatómicos, entre otros.

Muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas formadas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes en que se cultivan (Buddenford-Joosten y Woltering, 1994). Se ha descrito que las plantas cultivadas en estas condiciones carecen de una cutícula bien desarrollada, sus estomas no son totalmente funcionales y, presentan un comportamiento mixótrofo (Debergh y Zimmerman, 1991). Estos condicionantes hacen que no sea posible el estudio de parámetros fotosintéticos en plantas cultivadas *in vitro*.

Por otra parte, numerosos estudios evidencian que las plantas cultivadas en condiciones *in vitro* muestran un comportamiento idéntico al que tiene en condiciones de cultivo en campo (revisado en Pérez-Clemente y cols., 2006). Troncoso y cols. (1999) mostraron que plantas de diferentes portainjertos de vid cultivadas *in vitro* en condiciones de estrés salino acumulaban niveles de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  similares a los que presentaban plantas sometidas al mismo estrés y cultivadas en invernadero.

Debido a la dificultad que presenta el estudio de las respuestas los cítricos a condiciones de estrés abiótico en plantas cultivadas en campo, se planteó como uno de los objetivos de este trabajo el establecimiento de un sistema *in vitro* que permitiera abordar este estudio en condiciones controladas. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando material vegetal del genotipo CC. En primer lugar se determinaron las condiciones óptimas de cultivo (composición de la solución nutritiva, reguladores de crecimiento, etc.), tanto para brotes aislados como para plantas completas. A continuación se llevaron a cabo diferentes experimentos en los que se

sometió a las plantas y brotes a condiciones de estrés utilizando PEG-6000. Los polímeros de polietilenglicol de elevado peso molecular se han utilizado para simular el estrés por sequía en plantas ya que, al ser soluble en agua, este polímero flexible puede usarse para crear grandes presiones osmóticas. Aunque no penetra en los tejidos, el PEG-6000 provoca descensos en el potencial osmótico de forma similar a lo que ocurre cuando se seca el sustrato en el que se cultivan las plantas (Larher y cols., 1993).

De forma similar a lo observado en cítricos cultivados en campo, cuando las plantas cultivadas *in vitro* se sometieron a condiciones de estrés hídrico, tuvo lugar una disminución de su crecimiento respecto a las plantas control, siendo esta reducción mayor cuanto más severo era el estrés impuesto. Atendiendo a la reducción del tamaño de la planta y a la sintomatología foliar se establecieron las concentraciones de PEG-6000 que era necesario añadir al medio de cultivo para estudiar condiciones de estrés severo y moderado. En el caso de plantas intactas se eligió para el estudio del estrés moderado aquella concentración que provocaba una presión osmótica de -0.75 MPa (PEG075) y para el estudio del estrés severo una concentración que aumentaba la presión a -1.50 MPa (PEG150). En el caso de brotes, la presión osmótica que causaba un estrés moderado era -0.50 MPa (PEG050) y un estrés severo -0.75 MPa (PEG075). Esta diferencia puede ser debida a que la ausencia de la raíz dificulta la absorción por parte de la planta del agua disponible en el medio de cultivo.

La sintomatología foliar observada en plantas y brotes sometidos a estrés hídrico (deshidratación del tejido, necrosis en el extremo distal de la hoja, que se extiende por el limbo a medida que progresa el tiempo de estrés) coincide con la descrita por varios autores en cítricos cultivados en campo en condiciones de sequía (Arbona y cols., 2005; Mahouachi y cols., 2005).

Una ventaja del sistema de cultivo *in vitro* descrito para el estudio del estrés osmótico en cítricos es que permite estudiar con gran detalle las alteraciones y daños que sufre la raíz como consecuencia del estrés impuesto, lo que sería prácticamente imposible en plantas cultivadas *ex vitro*. En plantas sometidas a estrés se produjo una disminución del diámetro de la raíz, así como deformaciones de la misma además de necrosis del ápice radicular. Aunque en este trabajo no se han abordado estudios histológicos, sería un aspecto interesante para realizar en el futuro ya que podría esclarecer las causas de algunos de los daños observados en la parte aérea de árboles de campo cultivados en condiciones de sequía.

El sistema también ha permitido el estudio del estrés oxidativo inducido por una deficiencia hídrica. Los datos muestran una mayor incidencia del daño oxidativo en la parte aérea de las plantas estresadas lo cual concuerda con otros resultados previos realizados en plantas cultivadas en invernadero en condiciones de inundación continua del sustrato (Arbona y cols., 2008). En ambos sistemas se observa como los tejidos aéreos acumulan mayores cantidades de

MDA, un marcador indirecto del daño oxidativo. Este dato sería, en principio, esperable ya que los tejidos foliares generan mayores cantidades de ROS que las raíces debido al sistema fotosintético. Este fenómeno se estaría repitiendo en un sistema *in vitro* como el aquí descrito pese a que las plantas cultivadas en estas condiciones no presentan aparatos fotosintéticos plenamente activos. El fenómeno se repite en brotes aislados, validando el sistema y apuntando a un fenómeno específico de la parte aérea sin necesidad de la existencia de un sistema radicular. Sería interesante utilizar este sistema experimental en condiciones de estrés salino donde el efecto tóxico del cloruro sódico puede ser filtrado por la presencia de un sistema radicular (ver Capítulo 4) cuando las plantas se cultivan *ex vitro*. La incidencia del estrés oxidativo en la fisiología de los cítricos cultivados en condiciones de sequía no ha sido estudiada hasta el momento en profundidad debido a las dificultades que los sistemas de campo/invernadero presentan. Las plantas sometidas a sequía moderada en campo tardan demasiado tiempo en mostrar síntomas claros y es muy difícil realizar un seguimiento del daño oxidativo en dichas condiciones (Mahouachi y cols., 2005). Por el contrario, en el caso de choque osmótico (Gómez-Cadenas y cols., 1996), los procesos de senescencia/abscisión ocurren tan rápido que no es posible estudiar el daño oxidativo y la posible respuesta antioxidante vegetal.

Por otra parte, la concentración de prolina aparece incrementada en raíces y hojas de las plantas sometidas a estrés hídrico tal y como se observó previamente. Más aún, en brotes aislados cultivados en presencia de PEG-6000 se observa el mismo incremento en los niveles endógenos de este aminoácido. Se había descrito con anterioridad que los niveles de prolina aumentan en las hojas de CC y MC en respuesta a condiciones de estrés salino (Gómez-Cadenas y cols., 1998; Arbona y cols., 2003), de inundación del sustrato (Arbona y cols., 2008) y de sequía (Molinari y cols., 2004). Por tanto, la acumulación de prolina parece una respuesta común de los cítricos a factores ambientales adversos. Más aún, los datos previos del grupo indican que la acumulación de prolina es directamente proporcional a la presión de estrés impuesta. Siguiendo esta lógica, los datos aquí mostrados confirmarían que las plantas cultivadas en presencia de PEG-6000 están sufriendo un estrés importante. Esta evidencia se suma a otros datos en la validación de este sistema de cultivo como método efectivo y versátil para el estudio del efecto del estrés hídrico en cítricos. Además, los datos parecen descartar la posibilidad de que la prolina participe como agente detoxificante de ROS o estabilizador de membranas tal y como han propuesto otros autores (Hamilton y Heckathorn, 2001). El efecto protector de una acumulación de prolina en tejidos de cítricos no parece un sistema efectivo ya que las plantas sometidas a concentraciones crecientes de PEG-6000 acumularon importantes cantidades de prolina de forma paralela al incremento de MDA. Estos datos serían compatibles con los mostrados en cítricos cultivados en condiciones de inundación continua del sustrato (Arbona y

cols., 2008) donde se observó que los genotipos más dañados por el estrés fueron precisamente los que acumularon más cantidad de este aminoácido.

Frente al estrés oxidativo inducido por la deficiencia hídrica, las plantas cultivadas *in vitro* son capaces de activar, al menos, parte de su maquinaria antioxidante celular. De esta forma, se observa como la actividad ascorbato peroxidasa aumenta tanto en raíces como en hojas de plantas intactas estresadas en relación a las plantas control. Esta tendencia se mantiene en brotes aislados. Sin embargo la actividad catalasa disminuye con respecto al control tanto en plantas como en brotes cultivados con ambas concentraciones de PEG-6000. Un comportamiento similar al descrito en este sistema se observó en plantas del mismo genotipo cultivadas *ex vitro* en invernadero y sometidas a estrés por inundación del sustrato (Hossain y cols., 2009). Pese a que se requerirían más análisis bioquímicos para completar el estudio de la capacidad antioxidante de las plantas cultivadas *in vitro* bajo condiciones de estrés, los datos permiten sugerir que en el sistema descrito en esta memoria, las plantas mantienen su maquinaria antioxidante intacta incluso cuando se cultivan brotes aislados.

Por último, frente al estrés hídrico impuesto, las plantas muestran una importante acumulación de ABA tanto en plantas intactas como en brotes aislados. Este dato, que coincide con otros obtenidos en plantas cultivadas en invernadero y campo (Gómez-Cadenas y cols., 1996; 1998; Arbona y Gómez-Cadenas, 2008) bajo condiciones de estrés hídrico, salino y por inundación del sustrato, refuerza el papel del ABA como mediador de las respuestas vegetales al estrés. También cabe destacar el hecho de que las hojas de cítricos pueden acumular la misma cantidad de ABA en condiciones de estrés aunque estén escindidas del sistema radicular. En contraposición al aumento de los niveles ABA que se registró durante todo el periodo experimental tanto en raíces como en hojas de cítricos, la concentración de SA únicamente aumentó en las últimas fechas de medición en la parte aérea de plantas intactas y en brotes aislados. El SA se considera una señal importante implicada en la resistencia de las plantas a varios ataques patogénicos (Álvarez, 2000) y también parece implicada en la respuesta vegetal al estrés oxidativo (Hayata y cols., 2010). Los datos aquí presentados son compatibles con esta hipótesis y se puede sugerir que el aumento tardío de la concentración de SA foliar en cítricos sometidos a estrés osmótico en condiciones de cultivo *in vitro* está relacionado con la aparición de daño oxidativo severo en tejidos fotosintéticos. El descenso en los niveles de JA observado en todo el periodo experimental tanto en hojas como en raíces de plantas intactas y en brotes aislados coincide con datos previos donde se observó que el JA actúa como mediador entre la percepción del estrés y la inducción de las respuestas fisiológicas y por tanto su actuación sería temprana (Arbona y Gómez-Cadenas, 2008). Probablemente, la primera toma de datos se realizó en una fecha demasiado tardía para encontrar el incremento transitorio de la concentración de JA.

En resumen, en este Capítulo se ha validado un sistema de cultivo *in vitro* tanto para plantas intactas como para brotes aislados. Este sistema permite profundizar en el estudio bioquímico de las repuestas de los cítricos a condiciones de estrés osmótico y salino. En este Capítulo se han mostrado datos que dan cuenta de la importancia del estrés oxidativo inducido por las elevadas concentraciones de PEG-6000 en el medio así como de la respuesta antioxidante vegetal y la regulación hormonal. En el Capítulo siguiente se estudia las repuestas de los cítricos al estrés salino.

## **4. ESTRÉS SALINO EN CÍTRICOS**

**Parte de los datos presentados en este Capítulo se encuentran publicados en:**

**Montoliu, A., López-Climent, M.F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A.** (2009) A novel *in vitro* tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. *Journal of Plant Growth Regulation* 59(2): 179-187.



## 4. ESTRÉS SALINO EN CÍTRICOS

### 4.1. INTRODUCCIÓN

Las respuestas de los cítricos a la salinidad presentan dos fases: una respuesta inicial, relativamente intensa y transitoria, atribuida al componente osmótico y una segunda fase, más lenta, probablemente solapada con la anterior, debida a la acumulación de iones tóxicos (Munns, 2002). Esta fase ión-específica de la planta en respuesta a la salinidad comienza cuando la sal acumulada alcanza concentraciones tóxicas en las hojas (Gómez-Cadenas y cols., 1998).

La exposición de las plantas a condiciones salinas provoca en primer lugar la inhibición del crecimiento vegetal, como consecuencia del descenso en el potencial hídrico del suelo. Durante este periodo, el estrés originado se debe a la presencia de sales en el exterior de las plantas y no en su interior. En esta primera fase, la reducción del crecimiento parece estar regulada por señales inhibitorias, como la acumulación rápida de hormonas vegetales que se originarían principalmente en la raíz. En estas condiciones, las distintas señales podrían transportarse hasta las hojas, induciendo respuestas generales de adaptación al estrés como son el cierre estomático o la acumulación de osmolitos compatibles, como la prolina. Debido a la acumulación de iones y solutos compatibles los cítricos son capaces de evitar la pérdida de la turgencia foliar y adaptarse transitoriamente a las nuevas condiciones (Gómez-Cadenas y cols., 2001a). Estas respuestas ralentizan el metabolismo pero permiten a la planta seguir creciendo. Sin embargo, durante la segunda fase, la entrada continua y masiva de iones  $\text{Cl}^-$  provoca la intoxicación y finalmente la abscisión foliar (Bañuls y Primo-Millo, 1992; 1995).

La capacidad de acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , así como la susceptibilidad a los mismos, varía considerablemente en las distintas especies vegetales (Munns y Tester, 2008). Para la mayoría, el  $\text{Na}^+$  parece alcanzar la concentración tóxica antes que el  $\text{Cl}^-$ . No obstante, para algunas especies, como los cítricos, el  $\text{Cl}^-$  se considera el ión más tóxico (López-Climent y cols., 2008; Moya y cols., 2002; 2003).

Las diferencias observadas en la tolerancia de los distintos patrones de cítricos a la salinidad se relaciona principalmente con la capacidad de excluir  $\text{Cl}^-$  (Bañuls y cols., 1997; Moya y cols., 2003) aunque la capacidad de conservar un alto rendimiento del sistema fotosintético también parece importante (López-Climent y cols., 2008). Ciertos genotipos de cítricos, por ejemplo los patrones mandarino Cleopatra (MC) o lima Rangpur, pueden clasificarse como relativamente tolerantes debido a su capacidad de restringir la entrada de iones  $\text{Cl}^-$  a las raíces mientras que otros, tales como citrange Carrizo (CC) o citrumelo CPB 4475 (CIT), han demostrado ser más sensibles a la salinidad (López-Climent y cols., 2008).

La salinidad causa suberización de los tejidos de la raíz (Walker y cols., 1984), disminución de la conductividad hídrica de la raíz, deterioro en la asimilación de los elementos minerales (Ruíz y cols., 1997), daños en los tejidos foliares (Chapman, 1968) y abscisión de hojas (Gómez-Cadenas y cols., 1998; 2002). Asimismo, la acumulación de cloruros en las hojas de los cítricos disminuye la tasa fotosintética neta, la transpiración y la conductancia estomática además de activar la maquinaria antioxidante de la planta (Arbona y cols., 2003; Iglesias y cols., 2004).

Por otra parte, estudios previos sugieren que los efectos fisiológicos inducidos por la salinidad en plantas podrían estar mediados por interacciones hormonales. La exposición de plantas adultas a condiciones salinas promueve un aumento de las concentraciones endógenas de ABA y de ACC, tanto en raíces como en hojas (Gómez-Cadenas y cols., 1998; 2002). Por lo tanto, el ABA y el etileno juegan un papel de moduladores de algunas de las respuestas de los cítricos a la salinidad (Gómez-Cadenas y cols., 1998).

Se ha demostrado que el sistema radicular desempeña un papel importante en la absorción del agua y de cloruros (Moya y cols., 2002). Se puede deducir que existe una mejora adaptativa del genotipo MC tolerante a la salinidad debido una correlación lineal entre el contenido de cloruro y el uso de agua (Moya y cols., 2003). Parece que MC tiene un mecanismo más restrictivo que CC para la afluencia de cloruros en las raíces, siendo más eficiente en la limitación de la traslocación del ión a la parte aérea (Moya y cols., 1999; 2002).

Puesto que las diferencias no sólo se restringen a la parte aérea o al sistema radicular, en plantas cultivadas en campo es muy difícil estudiar otras supuestas diferencias bioquímicas entre los genotipos de cítricos sensibles y tolerantes a la salinidad. En estas condiciones, bajo una determinada concentración de NaCl externa, MC siempre acumulará menos cloruro en las hojas que CC (López-Climent y cols., 2008; Moya y cols., 2002; 2003).

Con el fin de estudiar diferencias bioquímicas entre distintos patrones de cítricos sometidos a salinidad, se desarrolló un sistema de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. La hipótesis a estudiar fue si después de eliminar el sistema radicular, la absorción del cloruro sería similar en los genotipos con diferente tolerancia a la salinidad. Además, este sistema permitió estudiar la importancia del estrés oxidativo inducido por salinidad y otros parámetros de tolerancia junto con señales hormonales específicas.

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1. Material vegetal y medios de cultivo

#### 4.2.1.1. Efecto del estrés salino en plantas de diferentes genotipos de cítricos cultivadas en invernadero

El material utilizado en este estudio fue plantas de tres patrones de cítricos: citrange Carrizo (*Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.), citrumelo CPB 4475 (*Citrus paradisi* L. Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) y mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.).

Un primer experimento se llevó a cabo con plántulas de tres meses de edad cultivadas en invernadero en donde la humedad relativa se mantuvo entre 50 y 80 %, la temperatura diurna  $26.0 \pm 4.0$  °C y la temperatura nocturna  $18.0 \pm 3.0$  °C. Estas plantas se obtuvieron de la germinación de semillas. Como sustrato se utilizó una mezcla de turba, perlita y vermiculita (80: 10: 10).

Las plantas se regaron tres veces por semana con riego por goteo con 0.5 L de solución de Hoagland modificada para cítricos (Bañuls y cols., 1997). Tres meses después de la germinación, se aplicó en la solución de riego una concentración de 90 mM de NaCl. Se determinaron los porcentajes de plantas afectadas, el contenido de iones  $\text{Cl}^-$  en hojas, y el contenido de MDA, 10, 20 y 30 días después de iniciado el tratamiento.

En una segunda serie de experimentos llevados a cabo *in vitro*, se utilizó como fuente de material vegetal plantas de los diferentes patrones cultivadas en el invernadero. El establecimiento de los cultivos se llevó a cabo como se describe en el Apartado 3.2.1.1 del Capítulo 3 de esta Memoria.

#### 4.2.1.2. Determinación de la concentración de NaCl adecuada para el estudio

Al igual que en el Capítulo anterior, se procedió a la micropropagación de las plantas obtenidas, para disponer de suficiente cantidad de material vegetal para realizar los ensayos de estrés osmótico. Los brotes se cultivaron individualmente en tubos de ensayo, con medio de cultivo de multiplicación (MM) para promover el desarrollo de yemas axilares. Los brotes se individualizaron y se cultivaron en un medio de elongación (ME) para que alcanzaran una altura de 15 mm (ver Apartado 3.2.1.1). Los brotes elongados se mantuvieron en medio sin hormonas durante 15 días antes de iniciar los tratamientos de estrés.

Con el propósito de determinar la concentración de NaCl más adecuada para estudiar los daños causados por el estrés salino en cítricos, se añadieron diferentes concentraciones de NaCl al medio de cultivo (ME). Se consideró como la concentración más adecuada para el estudio aquella que causase en las plantas los daños propios de este estrés, sin llegar a causarle la muerte. Para realizar el estudio se cultivaron los brotes en medios de cultivo a los que se

añadieron concentraciones crecientes de NaCl. El medio ME1, corresponde al medio ME suplementado con 30 mM NaCl, el medio ME2 se corresponde con la adición de 60 mM al medio ME y ME3 en el que se adicionó 90 mM NaCl al medio de cultivo ME. Como control se cultivaron los brotes en medio ME. Después de 10, 20 y 30 días en cultivo se determinó el contenido de cloruro en tejido foliar y el porcentaje de plantas afectadas por estrés salino. Estos datos permitieron seleccionar 60 mM NaCl como tratamiento de estrés salino para los siguientes experimentos.

#### **4.2.1.3. Efecto del estrés salino en los brotes cultivados *in vitro* de los diferentes genotipos de cítricos**

En un segundo experimento, se estudió el efecto del estrés salino causado por 60 mM de NaCl en brotes de tres genotipos de cítricos con diferente tolerancia al mencionado estrés (CC, CIT y MC) cultivados *in vitro*. Los brotes control se cultivaron en ME mientras que los brotes sometidos a estrés se cultivaron en ME2. Se determinaron los porcentajes de brotes afectados por salinidad, contenido de Cl<sup>-</sup>, MDA, ABA y SA foliar a 10, 20 y 30 días después de iniciado el tratamiento.

#### **4.2.1.4. Estudio del efecto del estrés salino a tiempos cortos**

En experimentos posteriores se utilizaron los brotes de CC como material vegetal. Los brotes fueron sometidos a un tratamiento salino de estrés como se describe anteriormente. El material vegetal fue recogido después de 2, 5, 10 y 20 días de la imposición del estrés. Se analizó el contenido de Cl<sup>-</sup>, MDA, ABA y SA en hojas.

#### **4.2.1.5. Estudio del efecto de los reguladores de crecimiento utilizados**

Se realizó un nuevo experimento para evaluar si los reguladores de crecimiento añadidos en los medios de cultivo habían tenido algún efecto sobre los resultados obtenidos. Se cultivaron brotes de CC en los siguientes cuatro medios: medio suplementado con reguladores de crecimiento, sin adición de NaCl (ME) o con 60 mM de NaCl (ME2) y medio sin reguladores de crecimiento, sin adición de NaCl (MB) o con adición de 60 mM de NaCl (MB60). Después de 20 días de tratamiento, se cuantificó el porcentaje de plantas afectadas por el estrés, se analizó la acumulación de Cl<sup>-</sup> y se determinó la concentración de MDA en el material vegetal.

En todos los experimentos, el material vegetal se cultivó en cámaras de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas (h) de luz y 8 h de oscuridad, una temperatura  $26.0 \pm 0.1$  °C y con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## **4.2.2. Seguimiento del cultivo y recogida de datos**

### **4.2.2.1. Síntomas visibles de daños de la hoja**

Los síntomas que se observan en las plantas cultivadas en campo/ invernadero en condiciones de estrés salino son: amarillamiento de las hojas, necrosis en los vértices de las hojas y en los ápices, y abscisión foliar, principalmente (Storey y Walker, 1999). Por lo tanto, para cuantificar los daños foliares en estos experimentos, se anotó de forma periódica el número de plantas afectadas. Se consideró que una planta afectada era aquella que mostraba al menos un 50 % de sus hojas con daños. El número de plantas afectadas se representó en valores porcentuales respecto del total de plantas sometidas a estrés salino. Para constatar la evolución de la sintomatología foliar característica del estrés salino en plantas tratadas con respecto a plantas control se tomaron fotografías de las plantas de forma periódica.

### **4.2.2.2. Obtención de material vegetal para las determinaciones analíticas**

Las hojas y los tallos se recogieron y se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier residuo del medio de cultivo. Seguidamente se trituraron y congelaron en nitrógeno líquido. El material vegetal se conservó a -80 °C hasta su utilización.

### **4.2.2.3. Determinación del contenido de cloruro**

El proceso de determinación de la concentración de cloruros se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Gómez-Cadenas y cols. (1998). En primer lugar, se pesaron 0.25 g del material vegetal fresco y se incubaron durante 12 h a temperatura ambiente en una solución de HNO<sub>3</sub> 0.1 N (Panreac, Barcelona, España) y ácido acético glacial 100 % (Panreac). Posteriormente, se filtró a través de un papel de filtro Whatman nº1. El líquido filtrado se utilizó para la valoración automática de los iones Cl<sup>-</sup> con un clorímetro automático (Modelo 926, Sherwood Scientific Ltd., Cambridge, RU).

### **4.2.2.4. Análisis de MDA y fitohormonas**

La cuantificación del daño oxidativo provocado por el estrés por salinidad se realizó mediante el análisis de la concentración de MDA, siguiendo el protocolo descrito por Arbona y cols. (2008) y Hodges y cols. (1999), tal y como se detalla en el Capítulo 3, Apartado 3.2.2.3, de esta Memoria.

Para la determinación de las fitohormonas se siguió el protocolo descrito en Arbona y Gómez-Cadenas (2008) y Durgbanshi y cols. (2005) tal y como se refleja en el Capítulo 3, Apartado 3.3.2.6.

### **4.2.3. Análisis estadístico**

Para la realización del ensayo se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados fueron analizados utilizando el programa informático S-PLUS 6.1 (Insightful Corporation). Los efectos de las diversas pruebas realizadas se determinaron mediante la aplicación del análisis de varianza unifactorial y separación de medias, de los datos tomados para cada día de tratamiento y para cada genotipo. En la separación de medias se usó el método de Tukey, con un nivel de significación de  $p \leq 0.05$ .

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Efecto del estrés salino en plantas de diferentes genotipos de cítricos cultivadas en invernadero

En un primer experimento, se regaron plántulas de tres meses de edad de tres genotipos de cítricos CC, CIT y MC, con una concentración de NaCl elevada (90 mM). El objetivo fue estudiar el efecto del estrés salino sobre material vegetal de corta edad (Tabla 4.1).

El daño en hojas de CIT fue evidente desde el primer día de medición. En este genotipo, después de 30 días de estrés, el porcentaje de plantas afectadas fue del 61 %. Las plantas de CC también mostraron daños evidentes debido a la mayor concentración de NaCl a partir del día 10, registrando el 50 % de plantas afectadas por el estrés en el día 30 después de iniciado el tratamiento. En cambio, el porcentaje de plantas de MC afectadas por salinidad fue sólo del 11 % a los 30 días.

La acumulación de iones tóxicos fue mayor en las plantas de CIT y de CC, mientras que en las hojas de MC, el contenido de cloruro fue mucho menor durante todo el período experimental. Los niveles basales de Cl<sup>-</sup> fueron menores en MC que los medidas en el resto de los genotipos.

La concentración de MDA en hoja aumentó en los genotipos sensibles (CIT y CC) y se mantuvo en niveles elevados durante todo el ensayo. Por el contrario en hojas de plantas de MC sometidas a estrés, el contenido de MDA fue similar al de las plantas control durante todo el período experimental.

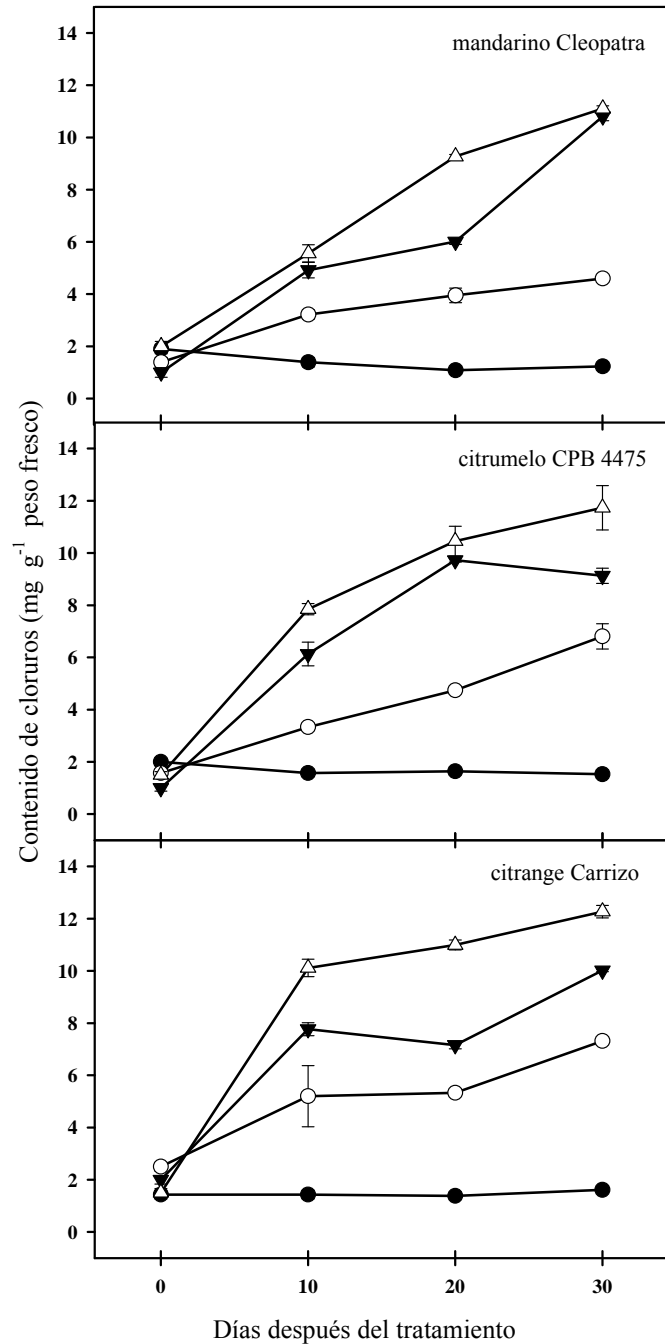
#### 4.3.2. Estudio del efecto de distintas concentraciones de NaCl en plantas de cítricos

Se cultivaron *in vitro* brotes de CC, CIT y MC sometidos a diferentes tratamientos salinos (30, 60 y 90 mM de NaCl) y se midió la concentración de Cl<sup>-</sup> después de 10, 20 y 30 días de cultivo (Figura 4.1).

La concentración de cloruros en los brotes control de los tres genotipos fue muy baja durante todo el período experimental. Después de la salinización del medio, los niveles del Cl<sup>-</sup> acumulado en los brotes aumentaron progresivamente en todos los genotipos y para todos los tratamientos. La concentración de Cl<sup>-</sup> foliar más alta fue determinada cuando se añadió al medio de cultivo 90 mM NaCl. Aunque los genotipos de cítricos estudiados mostraron patrones de acumulación de Cl<sup>-</sup> ligeramente diferentes (más rápidos en CC y CIT que en MC) todos tendieron a valores máximos similares al final del periodo experimental (Figura 4.1).

Para los experimentos posteriores, se estableció la concentración de 60 mM de NaCl como el tratamiento de estrés salino, por diversas razones: el daño causado por la salinidad fue gradual en todo el periodo experimental, es una concentración intermedia que no produce una alta

mortalidad (como la observada en los brotes tratados con 90 mM de NaCl) pero provoca una acumulación significativa y progresiva de Cl<sup>-</sup> (mayor que en el tratamiento de 30 mM).



**Figura 4.1.** Contenido de cloruros (Cl<sup>-</sup>) en brotes cultivados *in vitro* de tres genotipos cítricos sometidos a diferentes condiciones de estrés salino: medio control (●), medio suplementado con 30 (○), 60 (▼), y 90 (Δ) mM de NaCl. Cada punto corresponde a la media ± el error estándar de 6 determinaciones independientes.



**Tabla 4.1. Daño foliar, contenido de cloruro (Cl) y malondialdehído (MDA) en hojas de plantas cultivadas en invernadero de tres genotipos de cítricos sometidos a estrés salino.**

		Tiempo de tratamiento (días)					
		10		20		30	
		Control	90 mM NaCl	Control	90 mM NaCl	Control	90 mM NaCl
<b>Daño foliar</b> (% planta afectada)	citrange Carrizo	0.00 ± 0.00	6.15 ± 0.04*	0.00 ± 0.00	12.50 ± 0.80*	0.00 ± 0.00	48.42 ± 1.91*
	citrumelo CPB 4475	0.00 ± 0.00	12.02 ± 1.01*	0.00 ± 0.00	21.12 ± 3.29*	0.00 ± 0.00	61.08 ± 1.54*
	mandarino Cleopatra	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.00 ± 0.42*	0.00 ± 0.00	11.64 ± 0.29*
<b>Cl</b> (mg g <sup>-1</sup> peso fresco)	citrange Carrizo	4.14 ± 0.84	6.32 ± 0.39*	3.87 ± 0.65	14.47 ± 2.09*	5.11 ± 0.56	32.19 ± 0.98*
	citrumelo CPB 4475	2.36 ± 0.64	6.96 ± 0.80*	2.14 ± 0.58	18.24 ± 1.57*	2.94 ± 0.20	35.12 ± 2.67*
	mandarino Cleopatra	1.94 ± 0.20	2.53 ± 0.49*	1.47 ± 0.11	4.50 ± 0.95*	1.53 ± 0.01	12.61 ± 0.19*
<b>MDA</b> (nmol g <sup>-1</sup> peso fresco)	citrange Carrizo	29.57 ± 2.15	30.00 ± 1.58*	27.41 ± 1.21	42.01 ± 1.29*	27.78 ± 2.52	37.56 ± 2.00*
	citrumelo CPB 4475	25.65 ± 1.92	32.09 ± 2.19*	23.99 ± 2.08	51.19 ± 2.84*	26.39 ± 1.90	48.52 ± 3.25*
	mandarino Cleopatra	25.30 ± 1.81	24.22 ± 0.33	21.33 ± 0.63	23.76 ± 0.88*	22.43 ± 1.32	22.03 ± 0.50

\* Cada asterisco muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, con un nivel de significación de  $p \leq 0.05$ . Se representan medias  $\pm$  error estándar.

### 4.3.3. Efecto del estrés salino en los brotes cultivados *in vitro* de los diferentes genotipos de cítricos

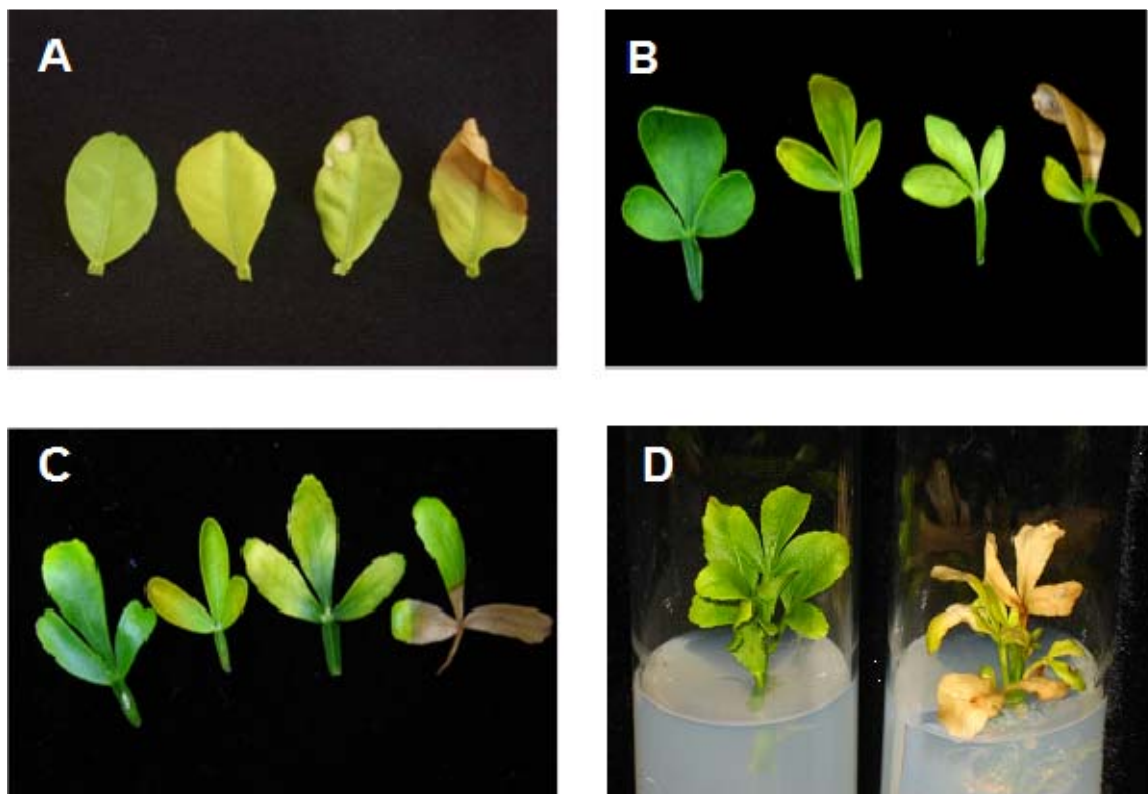
Es bien sabido que, en condiciones de campo, los síntomas causados por la salinidad son amarillamiento, necrosis de las hojas y abscisión foliar. En el sistema experimental que se describe en esta Memoria, los brotes de tres genotipos de cítricos con diferente tolerancia a la salinidad cuando se cultivan en campo, se cultivaron en medio salinizado con 60 mM de NaCl. Los daños foliares debidos a la exposición de los brotes a estas condiciones de estrés salino fueron evidentes a partir de los 10 ddt, en todos los patrones estudiados (Figura 4.2). Tanto el porcentaje de plantas afectadas como la severidad de los síntomas observados aumentaron con el tiempo de tratamiento. La evolución de la sintomatología foliar fue similar en los tres patrones, no encontrándose diferencias significativas entre ellos. Después de 10 días, se observó amarillamiento foliar en todos los genotipos. La clorosis foliar aumentó después de 20 ddt salino en todos los casos y, al final del tratamiento (30 días) el necrosamiento en el tejido foliar fue evidente en todos los genotipos.

Para cuantificar la aparición de toxicidad debido al ión  $\text{Cl}^-$ , se consideró que un brote estaba afectado cuando mostraba al menos el 50 % de sus hojas dañadas. La Figura 4.3 representa el porcentaje de brotes de CC, MC y CIT afectados por la salinidad a los 0, 10, 20 y 30 días de tratamiento. El daño foliar aumentó rápidamente en CIT (60 % de plantas afectadas frente a 20 % en MC y el 17 % en CC el día 10). Después de 20 días de tratamiento, el porcentaje de brotes dañados fue 75 y 66 % en CC y MC, respectivamente, mientras que casi todos los brotes de CIT mostraban un daño foliar evidente. En todos los casos, y a pesar de una ligera diferencia en el tipo de daño en las hojas, los brotes estaban severamente afectados después de 30 días de tratamiento (Figuras 4.2 y 4.3).

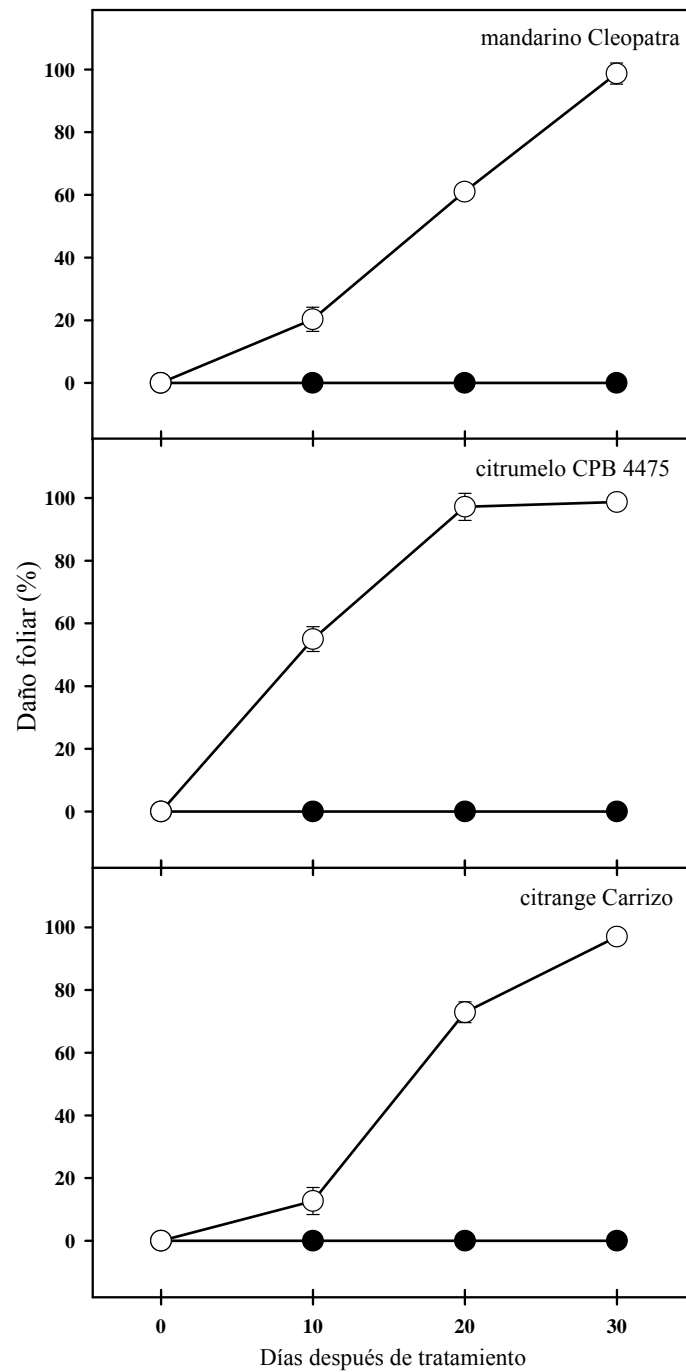
Se determinó el contenido de  $\text{Cl}^-$  en los brotes a 10, 20 y 30 ddt y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres genotipos estudiados (Tabla 4.2). En todos ellos, la acumulación de iones  $\text{Cl}^-$  fue progresiva durante el período experimental. Después de 10 días de tratamiento, la concentración del ión en brotes salinizados fue tres veces superior a la registrada en los controles. Al final del experimento, la concentración de  $\text{Cl}^-$  en brotes salinizados aumentó hasta alcanzar los valores más altos (que van desde  $1.63 \pm 0.09$  a  $3.30 \pm 0.04 \text{ mg g}^{-1}$  en los brotes control y de  $8.43 \pm 0.14$  a  $12.09 \pm 0.11 \text{ mg g}^{-1}$  en los salinizados).

Como indicador del daño oxidativo se midió el contenido de MDA en los brotes. En los genotipos CIT y MC no se encontraron diferencias significativas entre brotes estresados y control (Tabla 4.2). Sin embargo, en brotes de CC tratados con 60 mM de NaCl se observó una disminución del contenido de MDA 10 y 30 días después de iniciado el tratamiento. Se observó también, un ligero aumento el día 20 (1.2 veces superior al de los controles).

El tratamiento salino no indujo una acumulación de ABA importante en los brotes de ninguno de los genotipos estudiados en este trabajo (Tabla 4.2). En los brotes control, los contenidos de ABA fueron mayores en todos los genotipos durante todo el período experimental a excepción de un transitorio aumento en los brotes de CIT cultivados en medio salinizado después de 20 días. Se observaron valores elevados en los niveles de SA en los brotes sometidos a estrés de todos los genotipos estudiados después de 10 días de tratamiento (Tabla 4.2), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas en el caso de CC. Los valores analizados de esta hormona a 20 y 30 ddt fueron similares en ambos tratamientos, siendo los brotes control los que mostraron valores ligeramente superiores.



**Figura 4.2.** Efecto del estrés salino en diferentes genotipos cítricos. Amarillamiento, acucharamiento y necrosis en las hojas de mandarina Cleopatra (A), citrumelo CPB 4475 (B) y citrange Carrizo (C) afectado por salinidad. En cada imagen y de la izquierda a la derecha: hojas control y hojas a los 10, 20 y 30 ddt. (D) Hojas necróticas de mandarina Cleopatra después de 30 ddt (derecha) y control (izquierda).



**Figura 4.3.** Evolución de los daños foliares (%) de brotes cultivados *in vitro* de citrange Carrizo, citrumelo CPB 4475 y mandarina Cleopatra sometidos a estrés salino. Brotes cultivados en medio control (•) o medio complementado con 60 mM NaCl (○). Cada punto corresponde a la media  $\pm$  el error estándar de 60 determinaciones independientes.

**Tabla 4.2. Contenido de cloruros (Cl<sup>-</sup>), malondialdehído (MDA), ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (SA) en brotes de tres genotipos de cítricos sometidos a estrés salino (60 mM NaCl).**

		Tiempo de tratamiento (días)					
		10		20		30	
		Control	60 mM NaCl	Control	60 mM NaCl	Control	60 mM NaCl
<b>Cl<sup>-</sup></b> (mg g <sup>-1</sup> tejido fresco)	citrange Carrizo	1.92 ± 0.04	6.75 ± 0.01*	1.51 ± 0.05	7.56 ± 0.01*	3.30 ± 0.04	8.43 ± 0.14*
	citrumelo CPB 4475	1.70 ± 0.03	6.75 ± 0.02*	1.97 ± 0.03	9.50 ± 0.08*	2.27 ± 0.05	12.09 ± 0.11*
	mandarino Cleopatra	2.22 ± 0.07	5.48 ± 0.08*	2.14 ± 0.21	10.76 ± 0.53*	1.63 ± 0.09	9.17 ± 0.28*
<b>MDA</b> (nmol g <sup>-1</sup> tejido fresco)	citrange Carrizo	18.55 ± 1.46	12.74 ± 1.35	7.45 ± 0.85	9.21 ± 1.33	10.65 ± 2.92	8.46 ± 0.70
	citrumelo CPB 4475	10.99 ± 1.18	10.77 ± 1.47	11.02 ± 0.50	10.32 ± 0.51	11.87 ± 0.84	10.22 ± 1.55
	mandarino Cleopatra	-	-	10.34 ± 0.96	10.51 ± 0.76	12.41 ± 0.47	12.61 ± 0.74
<b>ABA</b> (ng g <sup>-1</sup> tejido fresco)	citrange Carrizo	37.20 ± 9.35	29.05 ± 4.99	53.55 ± 2.32*	23.65 ± 3.84	91.37 ± 8.31*	33.13 ± 3.95
	citrumelo CPB 4475	78.75 ± 7.51*	52.05 ± 2.74	40.70 ± 1.85	78.42 ± 14.54*	157.40 ± 7.38*	82.39 ± 3.40
	mandarino Cleopatra	104.50 ± 18.84	90.50 ± 3.16	26.00 ± 0.56	22.00 ± 2.30	24.95 ± 2.30*	13.30 ± 2.15
<b>SA</b> (ng g <sup>-1</sup> tejido fresco)	citrange Carrizo	57.60 ± 11.03	74.90 ± 9.05	79.45 ± 6.05	75.20 ± 2.66	108.15 ± 6.31*	57.15 ± 18.54
	citrumelo CPB 4475	33.25 ± 5.34	55.35 ± 6.32*	42.60 ± 4.98	54.25 ± 11.49	60.15 ± 5.28	62.20 ± 11.59
	mandarino Cleopatra	67.20 ± 4.88	176.45 ± 5.16*	116.10 ± 7.92*	71.35 ± 5.02	79.60 ± 9.02	62.35 ± 7.56

\* Cada asterisco muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, con un nivel de significación de  $p \leq 0.05$ . Se representan medias  $\pm$  error estándar.

#### 4.3.4. Efecto del estrés salino a tiempos cortos

Para investigar los efectos tempranos del estrés salino en brotes de CC cultivados *in vitro*, se midió el contenido de  $\text{Cl}^-$ , MDA, ABA y SA 2, 5 y 10 días después de someterlos a condiciones de salinidad (60 mM NaCl; Tabla 4.3).

En brotes control, el contenido de  $\text{Cl}^-$  se mantuvo casi invariable a lo largo de todo el periodo experimental. Por el contrario, el contenido de este ión en los brotes salinizados aumentó progresivamente en el tiempo. Dos días después del inicio del tratamiento, el contenido de  $\text{Cl}^-$  en los brotes salinizados fue 1.5 veces superior a los valores alcanzados en los brotes control. A los 10 días se alcanzaron niveles 4.6 veces mayores que en los controles.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MDA entre los brotes control y brotes sometidos a estrés salino durante un corto período de tiempo. Las concentraciones de MDA registradas después de 2 días de tratamiento fueron ligeramente superiores en los brotes salinizados que en los control ( $9.97 \pm 2.01$  vs  $10.39 \pm 0.49$  nmol  $\text{g}^{-1}$ ) al igual que ocurrió en brotes cultivados durante 10 días en medio suplementado con 60 mM NaCl ( $13.65 \pm 1.35$  vs  $14.87 \pm 1.76$  nmol  $\text{g}^{-1}$ ).

El contenido de ABA en los brotes control fue similar al medido en los brotes cultivados en medio salino, y sólo después de 5 días de tratamiento se observaron diferencias estadísticamente significativas. Como se observó en el ensayo anterior, el contenido de ABA en los brotes control fue mucho mayor que en los estresados ( $33.20 \pm 5.91$  vs  $9.60 \pm 1.40$  ng  $\text{g}^{-1}$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de SA, entre brotes control y salinizados después de 2 y 5 días de tratamiento. Después de 10 días de estrés, se produjo un aumento del contenido de esta hormona en brotes sometidos al estrés. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas con respecto al control (Tabla 4.3).

#### 4.3.5. Efecto de los reguladores de crecimiento utilizados en el medio de cultivo

Con el fin de esclarecer si la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo había tenido algún efecto en los resultados obtenidos se llevó a cabo un nuevo ensayo. Por un lado se cultivaron los brotes de CC en medio que contenía  $\text{GA}_3$  y BAP, tanto en el medio control como en el medio tratamiento (60 mM de NaCl); y por otro lado, se cultivaron brotes de CC en medio control y medio suplementado con 60 mM de NaCl, sin los mencionados reguladores de crecimiento. Se evaluó el daño foliar y se midieron contenidos de  $\text{Cl}^-$  y MDA después de 20 días de tratamiento (Tabla 4.4).

Los brotes cultivados en los medios de cultivo ME, ME2, MB y MB60, mostraron el mismo comportamiento. Se observaron hojas sanas (sin daño evidente) en los brotes cultivados en ambos medios de cultivo (cuando no se adicionó NaCl al mismo, Tabla 4.4). Esto sugiere que

no es necesario la adición de hormonas al medio para mantener los brotes *in vitro* durante 20 días. Los brotes cultivados en condiciones de estrés salino mostraron daños foliares (daños en aproximadamente un 70 % de los brotes). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en brotes cultivados en medios suplementados con reguladores de crecimiento frente a los cultivados en medios que no los contenían en su composición. Se observaron incrementos similares en el contenido de  $\text{Cl}^-$  en los brotes cultivados en ambos medios salinizados ( $4.71 \pm 0.12 \text{ mg g}^{-1}$  en medio complementado con los reguladores de crecimiento y  $5.23 \pm 0.12 \text{ mg g}^{-1}$  en los medios de cultivo sin los reguladores). De la misma manera, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de MDA entre los brotes cultivados en medio control y medio suplementado con 60 mM de NaCl, tanto si en su composición contenían reguladores de crecimiento o no.

**Tabla 4.3. Contenido de cloruros (Cl<sup>-</sup>), malondialdehído (MDA), ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (SA) en brotes de citrange Carrizo después de 2, 5 y 10 días de tratamiento salino.**

	Tiempo de tratamiento (días)					
	2		5		10	
	Control	60 mM NaCl	Control	60 mM NaCl	Control	60 mM NaCl
<b>Cl<sup>-</sup></b> (mg g <sup>-1</sup> tejido fresco)	1.68 ± 0.03	2.73 ± 0.04*	1.72 ± 0.08	5.02 ± 0.09*	1.15 ± 0.04	5.38 ± 0.13*
<b>MDA</b> (nmol g <sup>-1</sup> tejido fresco)	9.97 ± 2.01	10.39 ± 0.49	9.20 ± 1.04	8.65 ± 0.69	13.65 ± 1.35	14.87 ± 1.76
<b>ABA</b> (ng g <sup>-1</sup> tejido fresco)	25.20 ± 2.80	30.07 ± 3.87	33.20 ± 5.91*	9.60 ± 1.40	8.40 ± 1.60	11.33 ± 0.4
<b>SA</b> (ng g <sup>-1</sup> tejido fresco)	34.60 ± 13.00	27.73 ± 6.82	28.93 ± 5.28	37.80 ± 5.24	35.00 ± 3.60	56.73 ± 12.91*

\* Cada asterisco muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, con un nivel de significación de  $p \leq 0.05$ . Se representan medias ± error estándar.

**Tabla 4.4. Daño foliar, contenido de cloruros (Cl<sup>-</sup>) y malondialdehído (MDA) en brotes de citrange Carrizo cultivados en medio suplementado (+) con reguladores de crecimiento o cultivados en medio sin reguladores de crecimiento (-). Determinaciones después de 20 días de tratamiento salino.**

	Tratamiento			
	+		-	
	Control	60 mM NaCl	Control	60 mM NaCl
<b>Daño foliar</b> (%)	0.00 ± 0.00	72.90 ± 1.10*	0.00 ± 0.00	68.00 ± 0.20*
<b>Cl<sup>-</sup></b> (mg g <sup>-1</sup> peso fresco)	1.67 ± 0.03	4.71 ± 0.12*	1.63 ± 0.07	5.23 ± 0.12*
<b>MDA</b> (nmol g <sup>-1</sup> peso fresco)	14.03 ± 0.77	16.62 ± 1.34	8.75 ± 0.83	9.17 ± 1.97

\* Cada asterisco muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, con un nivel de significación de  $p \leq 0.05$ . Se representan medias ± error estándar.



#### 4.4. DISCUSIÓN

Tradicionalmente, el estudio de las respuestas y adaptaciones de los cítricos a diferentes tipos de estrés se ha llevado a cabo mediante ensayos en campo. Ello implica que sean necesarios largos periodos de tiempo, gran cantidad de mano de obra y que los resultados estén influenciados por numerosas variables ambientales. Como consecuencia, no existe una única clasificación de los patrones de cítricos en relación a su tolerancia al estrés salino (Maas, 1993).

Las técnicas de cultivo *in vitro*, pueden solucionar algunas de estas limitaciones (Zhang y cols., 1998) ya que permiten el cultivo de plantas clonales en condiciones climáticas y nutricionales idénticas durante todo el año. Se ha descrito que en condiciones de invernadero, las hojas de plantas sometidas a estrés salino de los genotipos CC y CIT, sensibles a la salinidad, acumulan mayores cantidades de  $\text{Cl}^-$  que las hojas de MC, genotipo tolerante (Tabla 4.1; López-Climent y cols., 2008; Romero-Aranda y cols., 1998). En estas condiciones, la acumulación de  $\text{Cl}^-$  en hoja es totalmente dependiente del sistema radicular, que tiene un papel importante en el control de la entrada de iones cloruro (López-Climent y cols., 2008; Moya y cols., 2002; 2003). El genotipo tolerante MC posee un mecanismo más restrictivo que CC o CIT (genotipos sensibles) para la captación de  $\text{Cl}^-$  a nivel de raíz. Por tanto, bajo condiciones de cultivo en estrés salino, las plantas de CC y CIT siempre acumularán más cloruro en hojas que las plantas de MC (Tabla 4.1; López-Climent y cols., 2008; Moya y cols., 2002; 2003).

El enfoque del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* utilizado en este trabajo permite estudiar el comportamiento de diferentes genotipos de cítricos evitando el efecto de la raíz, y comprobar si eliminando el sistema radicular de la planta, MC responde de la misma manera que en condiciones de campo. Con los resultados obtenidos en este estudio se ha puesto de manifiesto que éste no es el caso. De manera diferente a lo observado en las plantas cultivadas en invernadero en condiciones de alta salinidad, tanto los brotes de genotipos sensibles como los genotipos tolerantes a la salinidad acumularon cantidades similares de  $\text{Cl}^-$  cuando carecían de sistema radicular. El contenido de  $\text{Cl}^-$  en los brotes aumentó con la adición de NaCl al medio de cultivo, y proporcionalmente a la cantidad de NaCl añadida al medio. Estos datos muestran que el cultivo *in vitro* permite estudiar otros posibles factores fisiológicos implicados en la tolerancia de los cítricos a la salinidad, cuando todos los genotipos presentan concentraciones similares de  $\text{Cl}^-$  en hojas. El porcentaje de plantas afectadas por la salinidad en MC fue similar al obtenido en CIT y CC, después de 30 días de tratamiento de estrés salino. Por otra parte, los brotes de MC, presentaron síntomas en hoja similares a los mostrados en CIT y CC. La sintomatología de las plantas cultivadas *in vitro* sometidas a estrés salino fue similar a la descrita en plantas cultivadas en campo (Storey y Walker, 1999). Estos síntomas fueron más severos a medida que transcurría el tiempo de tratamiento. Se observó clorosis foliar 10 ddt y, al

final del experimento, la necrosis fue evidente en las hojas de todos los genotipos estudiados. El sistema de cultivo *in vitro* descrito ha permitido comprobar que independientemente de la tolerancia a la salinidad en campo de los genotipos estudiados, al ser cultivados desprovistos del sistema radicular todos acumularon cantidades similares de Cl<sup>-</sup> en hojas. Este estudio no se podría haber realizado en condiciones de campo, por lo que el método propuesto parece ser una buena herramienta para el estudio de los procesos bioquímicos implicados en la respuesta de los cítricos al estrés salino.

En la literatura se ha descrito que callos de patrones de cítricos tolerantes al estrés salino acumulan concentraciones mayores de Cl<sup>-</sup> que los obtenidos a partir de genotipos tolerantes a salinidad (Singh y cols., 2004). Esta discrepancia con los resultados descritos en esta Memoria puede ser debida a que el estado desdiferenciado de las células que constituyen los callos hace que éstos no se comporten como un sistema biológico. Además, mientras que el sistema utilizado por Singh y cols. (2004) podría ser utilizado como una herramienta práctica para evaluar la tolerancia a la salinidad de cítricos en el germoplasma (debido al comportamiento similar de los callos y plantas intactas), nuestro sistema está orientado a interpretar la respuesta específica a la toxicidad de iones entre los genotipos, evitando el filtro de la raíz.

En diversas especies vegetales se ha correlacionado la tolerancia al estrés salino con un incremento en la respuesta antioxidante y una disminución en el daño oxidativo (Perl-Treves y Perl, 2002; Shalata y cols., 2001). Para estudiar el posible daño oxidativo inducido por salinidad en cítricos se determinó el contenido de MDA (Hernández y cols., 2000) en brotes de los diferentes genotipos. En plantas cultivadas en invernadero en las mismas condiciones de salinidad, MC no sufrió daño oxidativo, mientras que en CC y CIT sí se observó un incremento del contenido de MDA en la parte aérea, lo que es indicativo de la aparición de este daño. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los brotes estresados por salinidad y brotes control de MC y CIT cuando se cultivaron *in vitro* sin el sistema radicular. No existe una correlación entre el daño foliar y el estrés oxidativo, puesto que los síntomas foliares causados por la salinidad (coloración amarillenta, necrosis, etc.) se observaron en todos los genotipos estudiados, mientras que no se detectó acumulación de MDA. Por otro lado, el hecho de que el contenido de MDA en brotes control fue ligeramente superior al obtenido en las plantas estresadas, nos lleva a pensar que las plantas tratadas hayan activado sus sistemas antioxidantes, como respuesta frente al estrés salino. Por tanto se debe considerar otros factores como la intoxicación por iones Cl<sup>-</sup> como responsables de desencadenar un mal funcionamiento del metabolismo de estas plantas.

El ABA desempeña un papel fundamental en la respuesta de las plantas a condiciones de estrés abiótico (Christmann y cols., 2006; Gómez-Cadenas y cols., 1998). Se ha descrito que esta fitohormona es la señal que comunica el estrés hídrico desde la raíz a la parte aérea (Dodd y

cols., 2008). Los datos presentados en el Capítulo 3 de esta Memoria indican que los cítricos pueden acumular ABA en cultivos de brotes aislados sometidos a estrés osmótico. Además, se ha descrito previamente que el genotipo CC responde a la salinidad aumentando los niveles del ABA foliar (Gómez-Cadenas y cols., 1998). Estos experimentos se realizaron con las plantas intactas y es posible que tales tratamientos salinos provocaran un mal funcionamiento del sistema radicular que se tradujeran en daños en la fisiología en la parte aérea que, a su vez, promovieran el aumento de concentraciones endógenas de ABA tanto en raíces como en hojas (Gómez-Cadenas y cols., 2001). Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo osmoregulador y un órgano específico de respuesta al estrés. Esta sugerencia es apoyada también por el hecho de que la expresión génica en respuesta al estrés salino es por lo general específica de órgano o tejido (Jia y cols., 2002). Cuando se cultivaron brotes *in vitro*, no se observó acumulación de ABA en ninguno de los genotipos estudiados, lo cual parece descartar el ABA como un mecanismo de señalización de este sistema. Estos resultados son similares a los obtenidos en maíz por Jia y cols. (2002), que observaron que el tratamiento de NaCl inducía una ligera acumulación de ABA en tejido foliar, mientras que el mismo tratamiento causaba una acumulación significativa de la hormona en el tejido radicular.

El aumento transitorio de los niveles de SA a 10 días de tratamiento salino podría sugerir un papel de esta hormona en la respuesta de los cítricos a la salinidad. Aunque es necesario profundizar los estudios en este sentido, nuestros datos sugieren la existencia de una señal común no relacionada con el genotipo, independientemente de su tolerancia a la salinidad. Tal y como se ha descrito en el capítulo anterior, la acumulación de SA podría señalar un daño oxidativo transitorio.

La falta de acumulación de ABA en brotes podría ser debida al hecho de que la señal para aumentar la biosíntesis deba ocurrir en las raíces y la falta de este tejido en este sistema haga imposible que se produzca esta señal. También sería posible que la señalización hormonal tuviera lugar antes de 10 días de tratamiento salino, momento en que se registraron los valores de contenido de esta hormona en el experimento descrito. Para excluir esta última posibilidad, y para esclarecer los efectos tempranos del estrés salino sobre el crecimiento *in vitro* de brotes de cítricos, se determinó el contenido del ión Cl<sup>-</sup>, de MDA y de hormonas en brotes de CC después de 2, 5 y 10 días de tratamiento de estrés salino. La acumulación de Cl<sup>-</sup> en brotes fue gradual en este breve período experimental. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de MDA, ni en los niveles de ABA y SA, entre brotes control y salinizados a cortos períodos de tratamiento, por lo que estos resultados no apoyan la teoría de una señalización temprana, dependiente de la síntesis del ABA o el SA en los brotes.

En este sistema no fue posible cuantificar los niveles de JA por problemas técnicos. Todas las medidas quedaron por debajo del límite inferior de cuantificación (LOQ). Sin embargo, se

puede apuntar que no existieron diferencias cualitativas en el perfil de acumulación de esta hormona entre los diferentes genotipos estudiados (datos no mostrados).

En resumen se puede concluir que cuando los brotes son cultivados sin el sistema radicular, todos los genotipos de cítricos estudiados, tanto los que en campo se comportan como tolerantes, como los sensibles, acumulan los mismos niveles de  $Cl^-$ . Además, presentan daños similares en las hojas como consecuencia de la imposición del estrés. Por otra parte, la ausencia de un aumento en los niveles de MDA en todos los genotipos, y los patrones comunes de señalización hormonal, en períodos de estudio desde 2 hasta 30 ddt indican que, en las mismas condiciones de cultivo y con el mismo nivel de acumulación de  $Cl^-$  foliar, no existen diferencias bioquímicas entre los genotipos. Los datos mostrados en esta Memoria junto a trabajos anteriores (Arbona y cols., 2008; Gómez-Cadenas y cols., 2002) indican que MC no parece mostrar ninguna ventaja a nivel bioquímico sobre el resto de patrones estudiados. Esto apunta a las raíces como un órgano clave no sólo como un filtro de iones  $Cl^-$  sino también como un sistema fundamental en la señalización hormonal de la respuesta al estrés salino en los cítricos. Estos datos se complementan con los expuestos en el Capítulo 3 de esta Memoria, donde se observa que en respuesta al estrés osmótico severo la señalización de ABA sí ocurre en hojas independientemente de la presencia del sistema radicular y dan cuenta de la complejidad del estudio del efecto del estrés salino en plantas.

## **5. ESTRÉS BIÓTICO EN CÍTRICOS**



## 5. ESTRÉS EN LIMA INDUCIDO POR CTV

### 5.1. INTRODUCCIÓN

El *virus de la tristeza de los cítricos* (CTV) es el causante de la enfermedad viral más grave de este cultivo y es conocida internacionalmente como tristeza (Bar-Joseph y cols., 1989). Este virus se trasmite por injerto, por algunas especies de pulgones y de forma mecánica mediante determinadas prácticas culturales (Cambra y cols., 1990a). La tristeza es la enfermedad que, desde el punto de vista económico, más daño ha ocasionado, y está considerada como una de las epidemias más destructivas e importantes que ha afectado a la citricultura a escala mundial (Cambra y Moreno, 2000).

La tristeza es originaria de Asia, desde donde se extendió a las principales zonas cítricas de todo el mundo. El virus fue probablemente introducido en España en la década de los años treinta y fue detectado en 1957, en la Comunidad Valenciana, cuando se convirtió en epidemia (Cambra y cols., 1990a; Planes y cols., 1965). Actualmente se encuentra presente en la mayoría de los países productores de cítricos, y se considera como una grave amenaza en aquellas zonas productoras donde el naranjo amargo es el patrón dominante (Roistacher y Moreno, 1991). Existe gran diversidad de cepas de CTV que son causantes de un amplio espectro de síntomas en las plantas a las que infectan. La presencia de cepas virulentas hace prácticamente inviable el cultivo de naranjos dulces y pomelos en aquellas áreas cítricas en las que están presentes (Naranjo, 1997b; Navarro, 1981).

En cuanto a los síntomas, existen tres síndromes característicos de la enfermedad: el llamado decaimiento rápido o tristeza (*Decline inducing*, DI), las acanaladuras o punteaduras del tallo (*Stem pitting*, SP) y el aclaramiento o clorosis discontinua de nerviaduras (*Seedling yellow*, SY) (Besoain y cols., 2003; Rocha-Peña y cols., 1995).

El decaimiento rápido o tristeza produce una extensa gama de síntomas. En primer lugar, produce un decaimiento lento, acompañado de clorosis. Ocasiona también defoliación de los árboles asociada con la pudrición de las raicillas. En segundo lugar, este síndrome provoca una disminución del tamaño del árbol acompañado de una reducción del tamaño de los frutos, que maduran antes y son de mala calidad. La tercera manifestación se conoce como *quick decline* o colapso rápido. Es la más espectacular, los árboles aparentemente sanos comienzan a mostrar un marchitamiento de las hojas similar al producido por falta de agua y en cuestión de una o dos semanas mueren (Besoain y cols., 2003; Rocha-Peña y cols., 1995). Esto es debido a que el CTV induce el colapso y necrosis de los tubos cribosos y las células acompañantes cerca de la unión del brote, produciendo una cantidad excesiva de líber no funcional (Schneider, 1959) que causa una progresiva reducción del sistema radicular y como consecuencia un aporte deficiente de agua y nutrientes. El síndrome de la tristeza se puede evitar usando patrones tolerantes al

CTV ya que la tristeza afecta a la combinación patrón/ variedad y su manifestación depende mucho de los genotipos utilizados (Moreno y cols., 2008).

Las acanaladuras del tallo, se producen como consecuencia de la interrupción de la actividad meristemática en áreas limitadas de cambium que da lugar a un crecimiento radial irregular con una depresión local en los puntos inactivados. Estas proyecciones puntiagudas de la corteza de la madera se ajustan perfectamente con las cavidades a nivel del xilema (Schneider, 1959). En las plantas infectadas tiene lugar un decaimiento y clorosis del follaje con pérdida de productividad. Los árboles afectados presentan atrofia, bajo rendimiento y pobre calidad de fruta (Besoin y cols., 2003; Rocha-Peña y cols., 1995). Las limas ácidas muestran la sensibilidad más alta a este síndrome, los pomelos y algunas variedades de naranja dulce sensibilidad intermedia, y los mandarinos la tolerancia más alta (Durán-Vila y Moreno, 2000; Timmer y cols., 2000). Los aislados de CTV que causan este síndrome predominan en la mayoría de las áreas cítricas (Gottwald y cols., 1999).

Por último, el aclaramiento se manifiesta en algunas especies de cítricos, tanto injertadas como de pie franco. Rara vez se observa en el campo (Moreno y cols., 2008) y se caracteriza por inducir atrofia, pequeñas hojas pálidas o amarillas, sistema radicular reducido y a veces un cese completo del crecimiento en algunos genotipos como naranjo amargo, pomelo o limonero (Fraser, 1952; McClean, 1960). A veces, las plantas que presentan este síndrome se recuperan y producen de nuevo hojas normales (McClean, 1963; Wallace y Drake, 1972).

Según su comportamiento ante el CTV, Carrero (1981) y Navarro (1981) clasificaron los distintos genotipos de cítricos como hipersensibles, muy sensibles, sensibles y moderadamente tolerantes. La lima mejicana se incluyó en el grupo de genotipos muy sensibles y se ha utilizado tradicionalmente como planta indicadora para diagnosticar la presencia del CTV (Wallace y Drake, 1951). La intensidad de los síntomas que provoca la infección depende de la cepa viral y del tiempo transcurrido desde la inoculación. En estos ensayos biológicos, se necesita un periodo de 4-6 meses desde la inoculación hasta la observación de los síntomas en las plantas de lima mejicana cultivadas a una  $T^a$  óptima entre 18 y 26 °C (Roistacher, 1991).

La respuesta de una planta a cualquier estímulo exógeno o endógeno es la consecuencia de una compleja red de interacciones entre distintas rutas de señalización. El ABA participa de forma activa en la señalización de muchas de las respuestas al estrés abiótico (Albacete y cols., 2009; Arbona y Gómez-Cadenas, 2008). Otras hormonas como el etileno, el SA y el JA, están implicadas en la transmisión de la señal de infección por patógenos (Dong, 1998; Feys y Parker, 2000). La señal generada por estas hormonas es transportada por cascadas moleculares complejas hasta llegar al núcleo celular donde participan tanto en la activación como en la represión de la transcripción de ciertos genes de respuesta (Azcón-Bieto y Talón, 2008).



Existen escasos trabajos que estudien la implicación de las fitohormonas en la regulación de la respuesta de los cítricos frente al estrés biótico producido por el CTV. Salvador y cols. (1984) estudiaron las alteraciones hormonales en plantas de lima mejicana infectada con CTV y determinaron que, en hojas jóvenes, no se producía incremento de la actividad auxínica ni se observaron variaciones en el contenido de ABA pero sí un aumento considerable de la actividad tipo giberelina. En cambio, cuando se determinaron los niveles hormonales en el floema de corteza se observó que el contenido de sustancias tipo giberelinas y tipo auxinas era mucho mayor en árboles infectados y que sólo se detectaba ABA en el floema de estos árboles (Salvador y cols., 1983). El efecto de la infección del virus en la biosíntesis y el metabolismo de la planta es muy complejo y se debe profundizar más en su conocimiento.

En especies herbáceas, sin embargo, existen numerosos trabajos sobre la interacción de virus y plantas, que estudian la influencia del virus en el transporte y actividad fisiológica de diferentes grupos de fitohormonas. Después de la infección viral, se produce un cambio en la biosíntesis y el metabolismo de las hormonas de la planta, especialmente en los niveles de JA y SA. Hay ejemplos de cambios en la biosíntesis y/o metabolismo de ABA, giberelinas, auxinas o citoquininas en uno o más sistemas vegetales (Jameson y Clarke, 2002; Yasuda y cols., 2008). No obstante, falta por determinar si esos cambios son debidos directamente a la invasión del virus, son consecuencia de la redistribución de asimilados o tienen lugar por los daños celulares derivados de la infección. Además, sería de gran interés conocer la relación entre los cambios en el metabolismo y la síntesis de JA, SA y etileno. Estudios de Sano y cols. (1996) indican que estos cambios pueden estar relacionados directamente con las citoquininas. Las rutas de señalización hormonal no son independientes y lineales, por lo que la comprensión de cualquier ruta requiere también entender qué interacciones establece con otras y cómo se regulan esas interacciones desde un punto de vista molecular (Jameson y Clarke, 2002; Vlot y cols., 2009). En algunas publicaciones se describe la acumulación de SA, JA y etileno en plantas enfermas aunque no hacen referencia a la interacción con el virus (Feys y Parker, 2000; Vlot y cols., 2009), debido a la gran complejidad de los senderos de transducción de señal que funcionan en la defensa de la planta (Inoue y cols., 2001; Smith y cols., 2000; Takei y cols., 2001; Yang y cols., 2006).

La exposición de la planta a condiciones desfavorables provoca un estrés oxidativo (Arbona y cols., 2003; 2008). El proceso de infección por patógenos está modulado específicamente por las condiciones lumínicas de crecimiento de la planta (Karpinski y cols., 2003). Durante el fotoperiodo, en condiciones naturales, el cloroplasto ha de adaptarse a las altas y bajas intensidades lumínicas para optimizar el uso de la luz absorbida durante la fotosíntesis, mantener un estado energético óptimo, un correcto balance NADPH/ATP y minimizar la formación de especies reactivas de oxígeno que se derivan de estos procesos. Esto implica el establecimiento de un equilibrio entre los llamados mecanismos fotoprotectores, que tratan de

disipar la energía de excitación en exceso, no utilizable en fotosíntesis y los mecanismos fotoinhibidores, que se activan cuando se excede la capacidad de fotoprotección y antioxidante de la planta (Arbona y cols., 2009a; Chow y cols., 2002; López-Climent y cols., 2008; Naumann y cols., 2008; Rahoutei y cols., 2000).

El virus emplea la maquinaria celular del huésped para replicarse y esto lleva a una alteración en la distribución del fotoasimilado dentro de la planta (Lucas, 2006). Esta alteración se ve incrementada debido a la activación de los mecanismos de defensa y síntesis de proteínas inducidas por el estrés (Balachandran y cols., 1997a; b; 2000). El aparato fotosintético actúa como un sensor ambiental mediante la generación de señales redox, que pueden regular la expresión de los genes como respuesta a distintos factores de estrés (Pfannschmidt y cols., 2001; 2003).

En este Capítulo se estudian las respuestas fisiológicas y bioquímicas de plantas de lima mejicana infectadas con dos cepas de CTV. Se estudia el daño foliar así como el daño oxidativo inducido por el patógeno. Además, se investigan las respuestas de la planta frente al estrés biótico mediante el estudio de los parámetros de intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas y el estudio de la maquinaria antioxidante. Finalmente, se estudia la regulación hormonal de las diferentes respuestas fisiológicas, especialmente el patrón de acumulación de ABA, JA y SA, así como los cambios metabólicos inducidos en las hojas de la planta por CTV.

## **5.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.2.1. Material vegetal**

#### **5.2.1.1. Cultivo de plantas**

En los diferentes ensayos se utilizaron plantas de lima mejicana (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.) procedentes de semilla. El estudio se llevó a cabo sobre plantas control y plantas infectadas por dos cepas de CTV facilitadas por el Dr. Pedro Moreno del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

Las plantas se cultivaron en macetas de plástico de 20 cm de diámetro y 20 cm de altura que contenían como sustrato una mezcla turba y arena (1:1) (Arregui y cols., 1982). Las condiciones de cultivo dentro del invernadero fueron: una humedad relativa de entre 50 y 80 %, una temperatura diurna de  $26.0 \pm 4.0$  °C y una temperatura nocturna de  $18.0 \pm 3.0$  °C.

Durante el tiempo que duraron los experimentos, las plantas se regaron tres veces por semana con 500 mL/ maceta de solución de Hoagland modificada para cítricos diluida a la mitad con agua desionizada (Bañuls y Primo-Millo, 1995).

#### **5.2.1.2. Diseño experimental e infección de las plantas**

Con el objetivo de obtener plantas de lima mejicana infectadas con CTV, se inocularon plantas de 12 meses de edad mediante injerto de chapas de corteza sin yema procedentes de plantas infectadas, bien con una cepa de virulencia severa (T318) o bien con una de virulencia moderada (T385). Las plantas que sirvieron como control fueron injertadas con corteza procedente de plantas sanas.

En un primer ensayo se utilizó como material vegetal plantas inoculadas ese mismo año. Las 18 plantas se distribuyeron de forma aleatoria en tres bloques: 6 plantas infectadas con la cepa T318, 6 plantas con la T385 y otras 6 plantas se utilizaron como control. El ensayo se repitió al año siguiente. Para ello se utilizaron plantas de lima mejicana con las mismas características agronómicas que el año anterior. Se podaron las plantas a una altura de 20 cm, se eliminaron todos los brotes y se procedió a la inoculación del virus con material vegetal infectado.

En ambos casos, las plantas se dispusieron en un recinto aislado del resto del invernadero, por motivos de seguridad sanitaria.

#### **5.2.1.3. Verificación de la infección de las plantas por CTV**

Para comprobar que las plantas del experimento estaban infectadas por CTV, se utilizó la técnica de inmunopresión-ELISA (del inglés: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). De la misma forma se comprobó que las plantas control estaban libres del virus. Para ello, se seleccionaron 4 brotes por planta, de 10-15 cm de longitud. Se realizaron 2 impresiones por

brote (realizando 2 cortes perpendiculares al tallo) y se efectuaron 8 impresiones por planta. Las improntas en la membrana se realizaron inmediatamente después de cortar el brote. Posteriormente, las membranas se enviaron a un laboratorio externo para el revelado. En los análisis serológicos de inmunopresión-ELISA se utilizó la mezcla de anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 (Cambra y cols., 2000b) y el protocolo recomendado por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (2004).

## **5.2.2. Seguimiento del cultivo y recogida de datos**

### **5.2.2.1. Obtención de material vegetal para el ensayo**

Como material vegetal para el estudio, se escogieron las hojas de los brotes en crecimiento. Se diferenciaron 4 grupos según el número de hojas en cada brote: de 3 a 5 hojas, de 6 a 8 hojas, de 9 a 11 y de 12 a 14 hojas.

Las muestras se tomaron a primera hora de la mañana y todo el material muestreado se transportó desde el invernadero al laboratorio en un contenedor con hielo. Una vez en el laboratorio, las muestras se trituraron con nitrógeno líquido y se introdujeron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Este material se conservó en un congelador a -32 °C hasta su posterior utilización en los análisis.

### **5.2.2.2. Síntomas foliares característicos de la enfermedad en lima**

El CTV provoca en plantas de lima acanaladuras en la madera, aclaramiento de nerviaduras y acucharamiento de las hojas, por lo que se siguió la evolución de estos síntomas en las plantas objeto del ensayo. Los resultados se expresaron como porcentaje de plantas afectadas respecto del total. Los criterios utilizados para estudiar la intensidad de los síntomas foliares fueron los siguientes:

- Los síntomas se consideraron graves cuando, al menos el 50 % de las nerviaciones de las hojas presentaban aclaramiento, siendo al mismo tiempo el acucharamiento foliar muy acusado.
- Los síntomas se consideraron leves cuando el porcentaje de nerviaciones foliares afectadas era menor del 50 %, siendo la clorosis de las nerviaduras menos acusada que en el caso anterior y el acucharamiento de las hojas leve.

### **5.2.2.3. Parámetros de fluorescencia de clorofilas**

Para evaluar el funcionamiento del sistema fotosintético en condiciones de estrés biótico se midieron distintos parámetros relacionados con la fluorescencia de clorofilas. Para ello se utilizó un fluorómetro digital OS1-FL (Opti-Sciences, Tyngsboro, Massachussets, EEUU). Se seleccionaron al azar 5 plantas de cada tratamiento y se marcaron 4 hojas de tamaño intermedio, se adaptaron a oscuridad durante 30 min envolviéndolas con una hoja de cartulina negra y después se aplicó un pulso de luz saturante ( $5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). En estas condiciones la

fluorescencia se incrementa rápidamente desde un nivel mínimo ( $F_0$ ) hasta un valor máximo ( $F_M$ ). La diferencia entre ambos parámetros se denomina fluorescencia variable ( $F_V$ ), a partir de la cual se puede obtener la fluorescencia variable máxima de clorofilas ( $F_V/F_M$ ). La medida de la eficiencia cuántica del PSII bajo condiciones de luz actínica ( $\Phi_{PSII}$ ) se realizó sobre hojas adaptadas a las condiciones de luz reinante dentro del invernadero. A partir de las medidas que proporciona el instrumento se calcularon el resto de parámetros fotosintéticos, para describir mejor el sistema:

- 1)  $F_V/F_M=(F_M-F_0)/F_M$  (Björkman y Demming-Adams, 1987)
- 2)  $\Phi_{PSII}=(F_M'-F_S)/F_M'$  (Genty y cols., 1989)
- 3)  $NPQ=(F_M-F_M')/F_M'$  (Bilger y Björkman, 1990)

Donde  $F_0$  es la fluorescencia basal de clorofilas antes de aplicar el pulso de luz saturante,  $F_M$  es la fluorescencia máxima de clorofilas en hojas adaptadas a oscuridad,  $F_M'$  es la fluorescencia máxima de clorofilas en hojas bajo condiciones de iluminación actínica y  $F_S$  es la fluorescencia basal. El parámetro NPQ, determina la incidencia de procesos de disipación de energía mediante procesos que no emiten luz.

Todos estos parámetros están relacionados con diversos componentes de la cadena de transporte electrónico. Así, mientras  $F_V/F_M$  mide la viabilidad a nivel del PSII, obviando otros procesos que pueden tener lugar a nivel de la cadena de transporte electrónico fotosintético,  $\Phi_{PSII}$  mide el transporte no cíclico de electrones entre el PSII y el PSI. Mientras que, variaciones en  $F_0$  estarían relacionados con daños sobre los pigmentos antena y variaciones en NPQ con la capacidad del PSII de disipar energía.

Todos los cálculos se han realizado según Arbona y cols. (2009a), López-Climent y cols. (2008) y Maxwell y Johnson (2000).

#### 5.2.2.4. Parámetros de intercambio gaseoso

A lo largo del periodo experimental se midieron regularmente los distintos parámetros de intercambio gaseoso. Para ello, se seleccionaron 4 plantas al azar de cada tratamiento, eligiéndose para hacer las mediciones 4 hojas de tamaño medio en distintas posiciones de la planta. Se realizaron 3 mediciones por hoja. En total se realizaron 48 mediciones para cada tratamiento.

Para realizar las medidas se utilizó un analizador de gases con detector de infrarrojos (IRGA) portátil Lcpro+ (ADC bioscientific, Hoddesdon, RU). Las mediciones se realizaron por la mañana, entre las 8h 00' y las 11h 30' utilizando una radiación artificial de  $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La temperatura dentro del invernadero donde se tomaron los datos fue de  $26 \pm 4.0 \text{ }^\circ\text{C}$  y el flujo

molar de aire se fijó en  $150 \mu\text{mol s}^{-1}$ . Todas las medidas se realizaron a concentración de  $\text{CO}_2$  y de vapor de agua atmosféricas.

Durante el segundo año del experimento, no se pudieron realizar medidas de parámetros de fluorescencia de clorofilas ni de intercambio gaseoso en plantas de lima mejicana infectadas con la cepa T318 ya que las hojas eran demasiado pequeñas.

#### **5.2.2.5. Análisis de MDA y enzimas antioxidantes**

La determinación del daño oxidativo provocado por el estrés osmótico se realizó mediante el análisis de MDA. El cálculo del contenido de MDA se realizó de la misma forma descrita en el Capítulo 3, Apartado 3.2.2.3 de esta Memoria.

La extracción y la determinación de la actividad del enzima APX se realizó según el método espectrofotométrico descrito por Asada (1984) y la extracción y la determinación de la actividad del enzima CAT según el método de Brennan y Frenkel (1977). Tal y como se describe con más detalle en el Capítulo 3, Apartado 3.2.2.4.

#### **5.2.2.6. Determinación de la concentración de prolina**

Para la extracción y determinación de la concentración de prolina en hojas, se siguió el protocolo descrito por Bates y cols. (1973), detallado en el Capítulo 3, Apartado 3.2.2.5.

#### **5.2.2.7. Determinación de fitohormonas**

Para la determinación de estas fitohormonas se siguió el protocolo descrito en Durgbanshi y cols. (2005) descrito en el Capítulo 3, Apartado 3.2.2.6.

#### **5.2.2.8. Análisis metabolómicos**

Para realizar el estudio metabolómico de las plantas se incubaron 100 mg de tejido foliar en diferentes estadios fenológicos (brotes de 3 a 5 hojas, de 6 a 8 hojas, de 9 a 11 hojas y de 12 a 14 hojas) en dos pasos consecutivos en 400  $\mu\text{L}$  de una solución de metanol:agua (80:20) (ambos de calidad HPLC, Scharlau) enriquecida con kinetina (6-Furfurilaminopurina), biochanina A (5,7-dihidroxi-4'-metoxisoflavona;  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ), rutina (quercetina-3-rutinóxido;  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ ), ácido *o*-anisico (ácido 2,5-dicloro-6-metoxibenzoico;  $\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$ ), ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico;  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ ) y N-(3-indolilacetil)-L-fenilalanina ( $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ ), todos suministrados por Sigma-Aldrich, a una concentración de 1 ppm. La extracción se llevó a cabo mediante incubación en baño de ultrasonidos durante 10 min. A continuación, la solución resultante se centrifugó a 8600 rpm durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. Los pasos anteriores se repitieron dos veces, recogiendo el sobrenadante final en el mismo vial. La solución resultante se filtró a través de filtros de membrana de PTFE de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Los extractos (aliquotas de 20  $\mu\text{L}$ ) se analizaron mediante HPLC (Waters Alliance 2965 HPLC, Waters Corp., Milford, EEUU) acoplado mediante una interfase de electrospray a

presión atmosférica a un espectrómetro de masas tipo QTOF (QTOF I, Micromass Ltd., Manchester, RU). La separación del extracto se llevó a cabo en fase reversa en una columna de C18 (5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, 100 x 2.1 mm, XTerra™, Waters) utilizando como solventes agua ultrapura (A) y acetonitrilo (B; grado HPLC, Scharlau), ambos complementados con ácido fórmico (grado HPLC, Scharlau) al 0.1 % (v/v), a un flujo de 300  $\mu\text{L min}^{-1}$ . El gradiente usado fue: (0-4 minutos) 95:5 (A:B), (4.01-55 minutos) 5:95 (B), (55.01-60 minutos) 95:5 (B) y (60.01-65 minutos) 95:5 (A:B).

El análisis espectrométrico se llevó a cabo en modo electrospray positivo empleando nitrógeno como gas de nebulización y de desolvatación a un flujo de 100 y 800 unidades, respectivamente. La temperatura del bloque de la fuente se mantuvo a 120 °C y el gas de desolvatación a 350 °C. Se fijaron los voltajes para el tubo capilar, el cono y el extractor en 4 kV, 25 eV y 3 eV, respectivamente. Antes del análisis, el espectrómetro de masas QTOF fue calibrado infundiendo una solución de formiato sódico a un flujo de 25  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Después del calibrado, el error medio fue menor de 5 ppm. Durante la adquisición, se infundió de forma continua Leu-encefalina ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 556.2771$ ) a una concentración de 1 ppm como masa de referencia. Los datos fueron adquiridos en modo continuo en un rango de 50-900 uma (unidades de masa atómica). Los detalles sobre la metodología analítica se describen en Arbona y cols. (2009b)

Para estudiar la inducción o represión de metabolitos como respuesta de las plantas a la infección por CTV, en brotes en diferentes estadios fenológicos, se llevó a cabo el procedimiento descrito anteriormente. Las muestras vegetales se extrajeron y analizaron tal y como se ha descrito en el presente Apartado. Se analizaron los datos obtenidos utilizando el software Dchip (Li y Wong, 2001) mediante Análisis de Varianza (ANOVA) tomando 'tratamiento' (control, plantas infectadas con la cepa más virulenta, plantas infectadas con la cepa menos virulenta) como factor y asumiendo un  $p \leq 0.01$ .

### 5.2.3. Análisis estadístico

Para la realización del ensayo se utilizó un diseño completamente al azar. Salvo los estudios metabolómicos que requieren un análisis estadístico particular, tal y como se describe en el Apartado 5.3.2.8. La validez estadística del resto de parámetros se determinó mediante la aplicación del análisis de varianza unifactorial (ANOVA) y separación de medias (método de Tukey,  $p \leq 0.05$ ) de los datos. Los resultados fueron analizados utilizando el programa informático S-PLUS 6.1 (Insightful Corporation).

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. Daño foliar en plantas de lima mejicana infectadas con CTV

Para cuantificar los daños foliares se consideró que una planta afectada era aquella que mostraba al menos un 50 % de sus hojas con síntomas de infección por CTV. La Figura 5.1 muestra los daños foliares observados tras la infección. Los síntomas más característicos son: clorosis de nerviaduras, hojas de menor tamaño y acucharadas (curvatura del limbo foliar hacia el haz) y acanaladadura en la madera (Roistacher, 1991) (Figura 5.1 B; K).

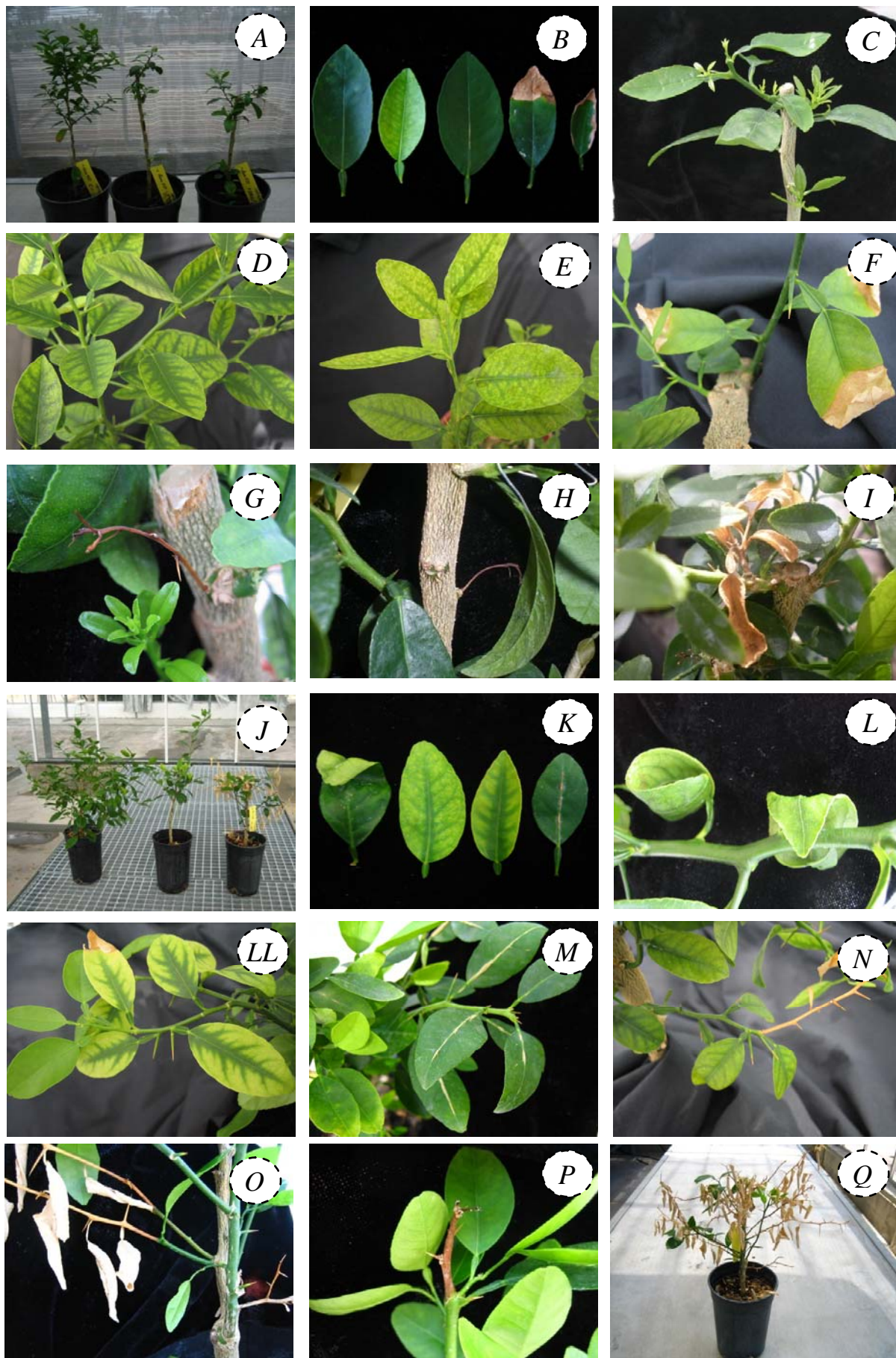
Los primeros daños causados por el CTV aparecieron en las plantas infectadas 4 semanas después de la inoculación. El primer síntoma en manifestarse fue el acucharamiento foliar, especialmente en las plantas infectadas con el aislado menos virulento (Figura 5.1 C) estas hojas presentaron además, una coloración verde muy oscura. A las 8 semanas, el 54 % de las hojas de las plantas infectadas manifestaron este síntoma, mientras que las plantas infectadas con la cepa más virulenta del virus el porcentaje era del 47 %. En cuanto al síntoma conocido como clorosis de nerviaduras, se observó en las hojas de las plantas independientemente del aislado con el que habían sido infectadas, siendo más evidente en hojas infectadas con la cepa del virus más agresiva (Figura 5.1 D). A las 10 semanas la proporción de plantas afectadas aumentó de forma muy acusada. Seis meses después de la infección, el porcentaje de plantas infectadas que mostraban este daño foliar fue muy próximo al 100 %. De forma simultánea, en plantas infectadas con el aislado T318 se observó una lignificación del nervio central, que pasó a tener una consistencia coriácea (Figura 5.1 B). A las 8 semanas un 25 % de las hojas de las plantas infectadas mostraron este síntoma y 23 semanas tras la infección se observó que esta lignificación se había extendido a las nerviaciones secundarias y las plantas empezaban a defoliarse. A las 20 semanas, otro síntoma observado en plantas infectadas con la cepa más virulenta fue la muerte de un 15 % de las nuevas brotaciones (Figura 5.1 G; H; I). Las hojas de las plantas infectadas redujeron su tamaño aproximadamente un 60 % con respecto a las plantas control (Figura 5.1 B). Este síntoma se observó en todas las plantas infectadas con la cepa más agresiva del virus, mientras que en el caso de plantas infectadas con la cepa suave aproximadamente el 70 % mostraban este síntoma.



Durante el segundo año después de la infección, el síntoma más característico fue la lignificación del nervio central de las hojas (Figura 5.1 M). Además se produjo, de forma generalizada, la muerte de brotes jóvenes, e incluso de pequeñas ramas en plantas infectadas con la cepa agresiva del virus (Figura 5.1 N; O; P). En un 80 % de las plantas infectadas, con independencia de la severidad del virus, las hojas presentaban un tamaño reducido (60 % con respecto al control), una coloración más oscura y lignificación tanto del nervio central como de las nerviaciones secundarias (Figura 5.1 J; K).

Durante el segundo año, en las plantas infectadas con la cepa agresiva del virus, se produjo una abscisión foliar generalizada y las acanaladuras en la madera se hicieron más evidentes (Figura 5.1 O). Tuvo lugar también, la muerte tanto de brotes jóvenes como de brotes en un estadio de desarrollo más avanzado (de 15 a 22 hojas). Además, se observó un decaimiento generalizado de la parte aérea de las plantas infectadas. El porcentaje de plantas que mostró esta sintomatología fue mayor en el caso de plantas infectadas con T318 (91 % vs 67 %; Figura 5.1 J).

**Figura 5.1. Síntomas foliares en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Primer año después de la inoculación: (A) Planta control, planta infectada con la cepa T385 y planta infectada con la cepa T318; (B) Daños en hojas infectadas (de derecha a izquierda): coloración verde oscuro y clorosis de las nerviaduras; moteado y clorosis internervial; nervio central lignificado; necrosis del extremo distal de la hoja; necrosis y hoja de menor tamaño; (C) Acucharamiento de las hojas; (D) Clorosis foliar; (E) Hojas moteadas; (F) Brote con hojas necrosadas; (G), (H), (I) Brotes jóvenes necrosados. Segundo año desde la inoculación: (J) Planta control, planta infectada con la cepa T385 y planta infectada con la cepa T318; (K) Síntomas foliares característicos de plantas infectadas (de derecha a izquierda): coloración verde oscuro y acucharamiento; moteado y clorosis foliar; clorosis foliar; nervio central lignificado; (L) Acucharamiento de las hojas; (LL) Clorosis generalizada y necrosis de los extremos de las hojas; (M) Nervio central y nerviaciones secundarias lignificadas; (N), (O), (P) Muerte de los brotes jóvenes; (Q) Decaimiento y muerte de brotes.



### 5.3.2. Parámetros de fluorescencia de clorofilas

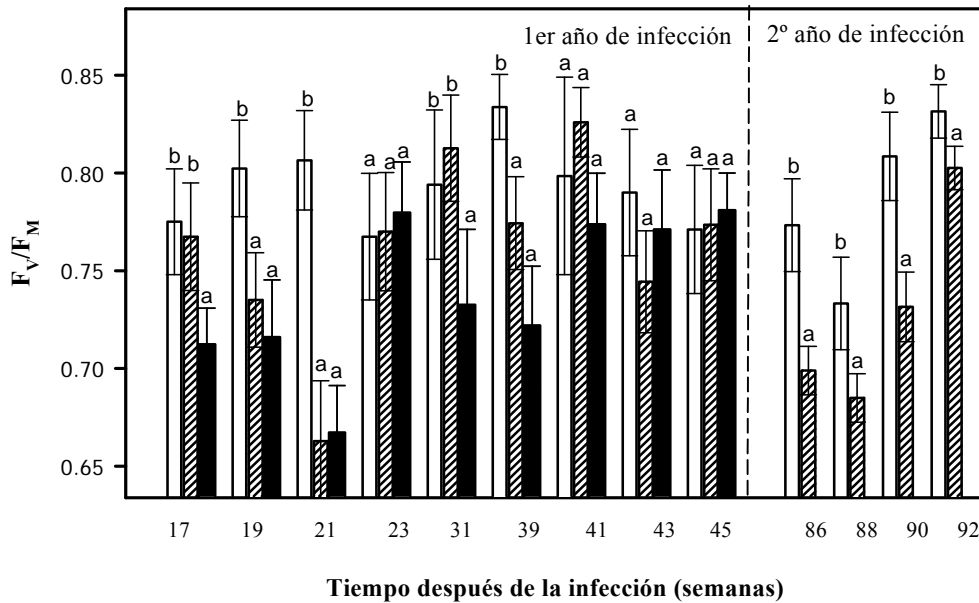
#### 5.3.2.1. Fluorescencia variable máxima de clorofilas ( $F_V/F_M$ )

En la Figura 5.2 se representa la fluorescencia variable máxima de clorofilas durante el primer y segundo año después de la infección. El estrés biótico inducido por CTV en plantas de lima afectó al parámetro de  $F_V/F_M$  en mayor o menor medida, dependiendo del tiempo transcurrido desde la infección. No obstante, no se observó una clara tendencia en la evolución de los valores de  $F_V/F_M$  en función de la virulencia de la cepa. A las 17, 19 y 21 semanas después de la infección, los valores de  $F_V/F_M$  en hojas de plantas infectadas fueron significativamente menores a los de plantas control. En plantas infectadas con la cepa menos virulenta el descenso más drástico de este parámetro tuvo lugar 19 y 21 semanas después de la infección, no encontrándose diferencias significativas entre los valores medidos en plantas infectadas con las cepas de diferente virulencia. En cambio, en plantas infectadas con el aislado más virulento, este descenso se produjo varias semanas antes. A las 17 semanas, los valores de  $F_V/F_M$  en plantas infectadas con T318, eran inferiores a los obtenidos tanto en plantas infectadas con T385 como en plantas control, que presentaron valores similares. Esta situación se mantuvo hasta 39 semanas después de la infección. En las siguientes mediciones (43 y 45 semanas) se observó una recuperación en los valores de este parámetro medidos en plantas infectadas que fueron semejantes a los obtenidos en plantas control. En todas las determinaciones llevadas a cabo el segundo año, los valores de  $F_V/F_M$  en plantas infectadas con el aislado T385 se mantuvieron por debajo de los obtenidos en plantas control.

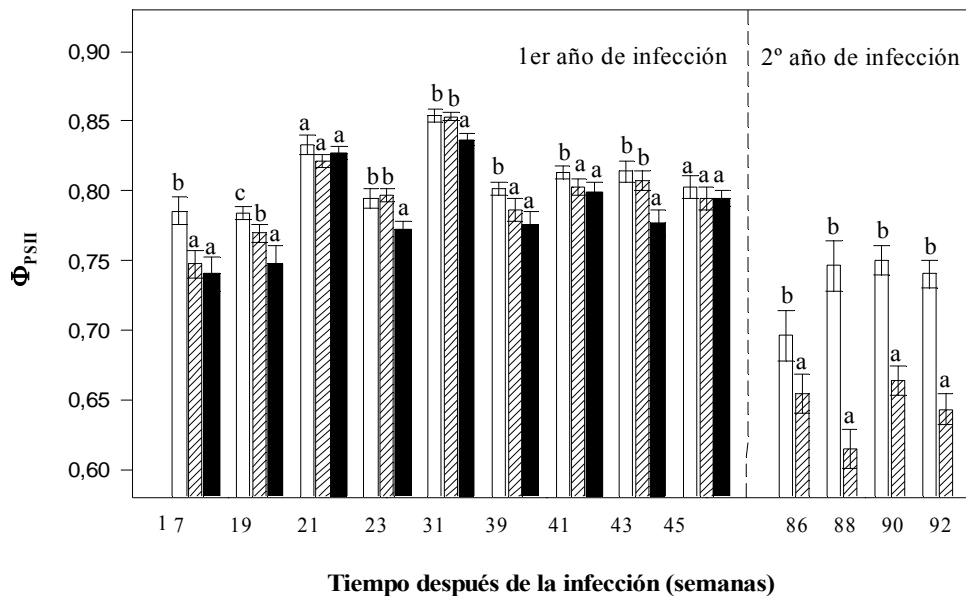
#### 5.3.2.2. Rendimiento cuántico del PSII (*quantum yield*, $\Phi_{PSII}$ )

El  $\Phi_{PSII}$  indica la proporción de la energía absorbida que está siendo usada en los procesos fotoquímicos. En la Figura 5.3 se representan los valores de  $\Phi_{PSII}$  obtenidos en plantas de lima en el primer y segundo año después de la infección. De forma similar a lo descrito en el caso de  $F_V/F_M$ , los valores de  $\Phi_{PSII}$  se redujeron en respuesta al estrés biótico. Durante el primer año tras la infección (panel izquierdo), los valores de  $\Phi_{PSII}$  de plantas infectadas con la cepa T318, fueron inferiores a los medidos en plantas control. El análisis estadístico reveló que las diferencias tenían relevancia estadística. La evolución de este parámetro en plantas infectadas con la cepa suave del virus fue diferente. Tras un periodo inicial (19 semanas) en que presentaron valores inferiores a los determinados en plantas control, se produjo una recuperación en la eficiencia cuántica de estas plantas, llegando a valores similares a los determinados en plantas control.

En el panel derecho de la Figura 5.3 se representan los valores de  $\Phi_{PSII}$  durante el segundo año tras la infección. En este periodo experimental, los niveles en el rendimiento cuántico medidos en plantas infectadas con la cepa T385 fueron inferiores a los determinados en plantas control.



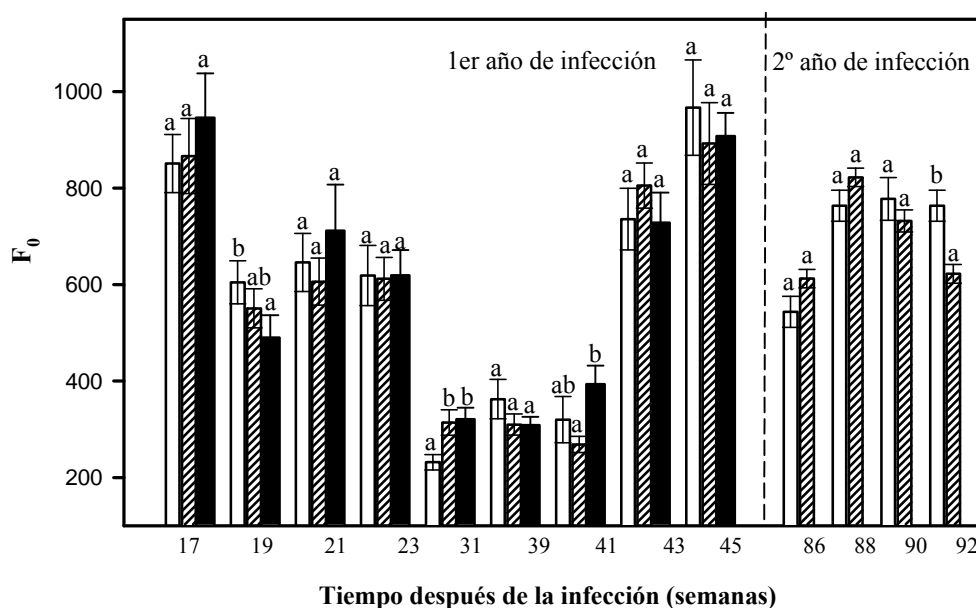
**Figura 5.2. Fluorescencia variable máxima de clorofilas ( $F_v/F_m$ ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada punto representa la media de 20 mediciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 5.3. Rendimiento cuántico del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada punto representa la media de 20 mediciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.3.2.3. Fluorescencia mínima de clorofilas después de adaptación a oscuridad ( $F_0$ )

$F_0$  representa la fluorescencia basal de clorofilas antes de aplicar un pulso de luz saturante. Las variaciones observadas en los valores de este parámetro en respuesta al estrés biótico están representadas en la Figura 5.4. La infección por CTV no produjo un incremento en este parámetro. Desde las 17 semanas tras la infección hasta transcurridas 23 semanas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre plantas control y plantas infectadas. Los valores de  $F_0$  obtenidos variaron durante todo el primer año tras la infección, pero sin llegar a experimentar diferencias estadísticamente significativas en plantas infectadas. A las 31 semanas se observó un aumento puntual en los valores de este parámetro en plantas infectadas (tanto con T385 como con T318), siendo los valores registrados 1.71 veces superiores a los obtenidos en plantas control. En las siguientes mediciones se observó un incremento de los valores de  $F_0$  en el caso de plantas control. No obstante, los valores obtenidos en plantas infectadas no fueron diferentes a los medidos en plantas control.



**Figura 5.4. Fluorescencia mínima de clorofilas después de adaptación a oscuridad ( $F_0$ ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada punto representa la media de 20 mediciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde ( $\square$ ) indica plantas control, ( $\square$  con rayas) indica plantas infectadas con la cepa T385 y ( $\blacksquare$ ) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

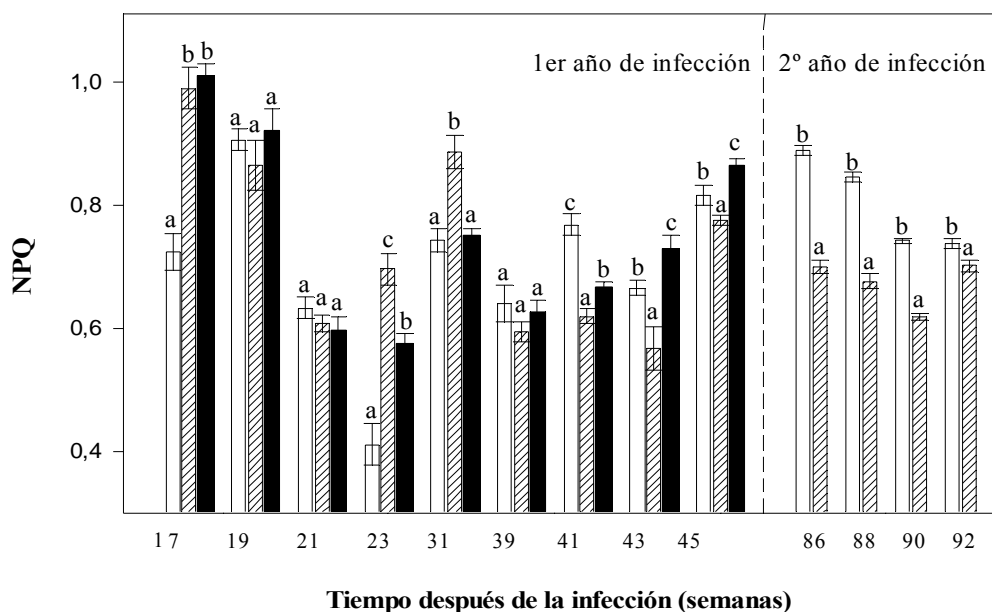
Durante el segundo año tras la infección (panel derecho, Figura 5.4), no se observaron diferencias en los valores de  $F_0$  en plantas infectadas con la cepa T385 con respecto al control. Únicamente a las 92 semanas después de la infección, los valores de  $F_0$  en plantas infectadas descendieron un 13.33 % con respecto a los valores obtenidos en plantas control. La tendencia

en los valores de la fluorescencia mínima de clorofilas fue hacia la estabilidad, tanto durante el primer como en el segundo año tras la infección.

#### **5.3.2.4. Disipación no fotoquímica (NPQ)**

En la Figura 5.5 se representa la evolución de la disipación no fotoquímica en plantas infectadas con CTV. Después de 17 semanas de infección, NPQ aumentó un 28.21 % en plantas infectadas con respecto a las plantas control, independientemente de la virulencia de la cepa. A las 23 semanas tras la infección, los valores de NPQ en plantas infectadas con la cepa T385 fueron 1.95 veces superiores a los obtenidos en plantas control, mientras que en las plantas infectadas con la cepa T318, el incremento fue del 19.00 %. En ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas, tanto respecto al control como entre cepas. En las siguientes mediciones, los valores de NPQ, descendieron en plantas infectadas con la cepa T318, registrándose valores similares a los obtenidos en plantas control. Treinta y nueve semanas después de la infección, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de plantas estudiadas. Esta tendencia varió a las 41 semanas, observándose un descenso significativo de NPQ en plantas infectadas (del 18.75 % en plantas infectadas con T385 con respecto al valor determinado en plantas control). Este parámetro también disminuyó en plantas infectadas con la cepa severa del virus, aunque el descenso no fue tan acusado (del 12.50 %). Los valores de NPQ en plantas infectadas con la cepa T385, en las siguientes mediciones hasta el final del primer año, fueron inferiores a los obtenidos en plantas control y en plantas infectadas con la cepa severa. Mientras que, en ese mismo periodo experimental, los valores de NPQ en plantas infectadas con T318, aumentaron, alcanzando valores 1.27 veces superiores a los valores control.

Durante el segundo año (panel derecho, Figura 5.5) se observó una clara tendencia a la disminución de NPQ en respuesta a la infección viral en plantas de lima. Ochenta y seis semanas después de la infección, los valores de NPQ en plantas infectadas con la cepa T385 fueron un 22.22 % más bajos que los obtenidos en plantas control. Este porcentaje se mantuvo durante las 4 semanas siguientes. En general, los valores de NPQ en plantas infectadas fueron significativamente menores que los obtenidos en plantas control durante todo el segundo año después de la infección.



**Figura 5.5. Disipación no fotoquímica (NPQ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada punto representa la media de 20 mediciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

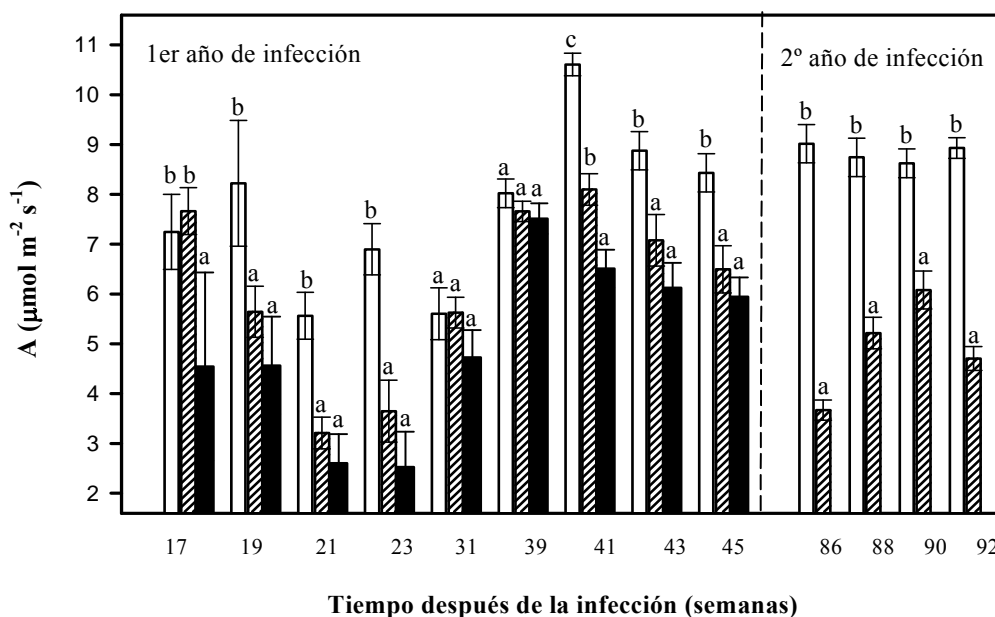
### 5.3.3. Parámetros de intercambio gaseoso

#### 5.3.3.1. Tasa fotosintética neta (A)

En la Figura 5.6 se muestra el comportamiento de la tasa fotosintética neta de plantas infectadas con dos cepas del virus de CTV en el primer (panel izquierdo) y en el segundo año (panel derecho) tras la infección.

La infección viral en las plantas provocó un descenso generalizado de la tasa fotosintética durante el primer año. Este descenso fue mayor en plantas infectadas con la cepa agresiva del virus que en plantas infectadas con la cepa menos virulenta; especialmente al principio de la infección, cuando la asimilación de  $\text{CO}_2$  se redujo un 62.50 % en plantas infectadas con la cepa T318 con respecto al control. A medida que transcurrió el tiempo, se observó una reducción drástica (del 73.60 %) en la tasa fotosintética en plantas infectadas con la cepa T385, manteniéndose en valores próximos a los obtenidos en las plantas infectadas con la cepa agresiva ( $5.64 \pm 0.51$  y  $4.56 \pm 0.98 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente). El valor mínimo de A para plantas infectadas con el aislado T385 fue de  $3.21 \pm 0.32$  a las 21 semanas y en las plantas infectadas con el aislado agresivo fue de  $2.53 \pm 0.71 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 23 semanas tras la infección. En las mediciones realizadas a las 31 y 39 semanas, se observó una recuperación en los niveles

de tasa fotosintética tanto en plantas infectadas con la cepa suave como con la agresiva. Se alcanzaron valores próximos a los obtenidos en las plantas control, no siendo las diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, durante el resto del primer año (41, 43 y 45 semanas) los niveles de A en plantas infectadas descendieron de forma significativa con respecto al control. Las diferencias entre plantas infectadas y plantas control se mantuvieron durante el segundo año tras la infección, con valores de A entre  $8.74 \pm 0.38$  y  $9.02 \pm 0.38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para las plantas control y entre  $3.67 \pm 0.20$  y  $5.22 \pm 0.31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para las plantas infectadas con la cepa suave del virus.



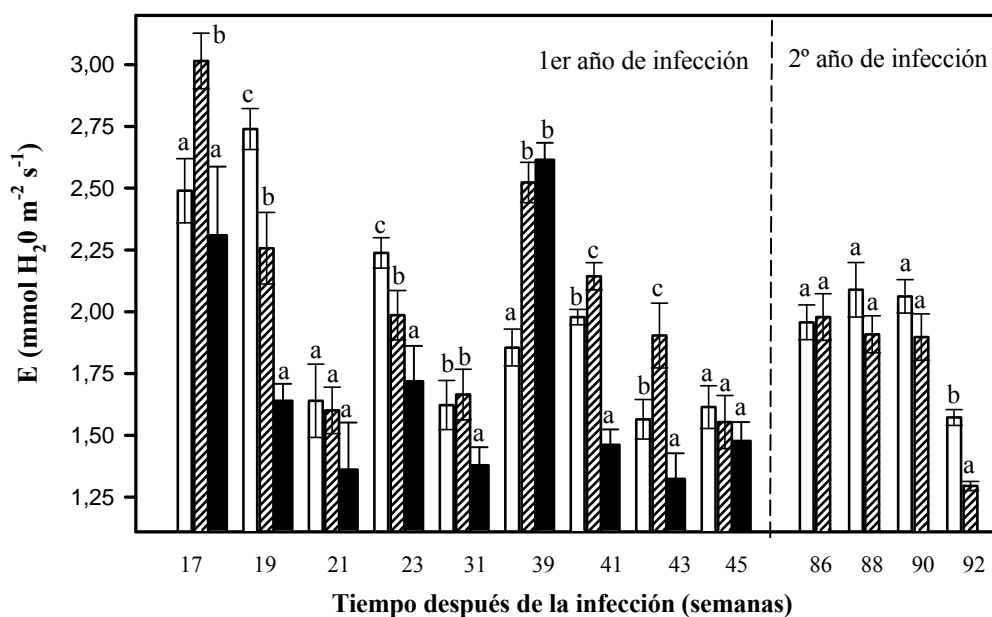
**Figura 5.6.** Tasa fotosintética neta (A) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV. Cada barra representa la media de 48 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.3.3.2. Tasa de transpiración (E)

En la Figura 5.7 se representa la tasa de transpiración de las plantas infectadas con CTV a diferentes tiempos después de la inoculación. En las plantas infectadas con la cepa T385 se observó un incremento de la tasa de transpiración al inicio de la infección, siendo el valor de E 1.21 veces superior al obtenido en plantas control. En posteriores mediciones se observó un descenso en este parámetro en plantas infectadas. El descenso más drástico para plantas infectadas con el aislado T318 tuvo lugar 19 semanas tras la infección alcanzando valores de  $1.64 \pm 0.07$ , mientras que en las control fue de  $2.74 \pm 0.08 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Esta reducción se mantuvo hasta mitad del primer año. A las 31 semanas de la infección, los valores obtenidos en



plantas infectadas con la cepa suave fueron muy similares a los valores medidos en las plantas control, mientras que en las plantas infectadas con la cepa más virulenta fueron ligeramente inferiores. Esta pauta en la tasa de transpiración varió 39 semanas tras la infección, cuando se produjo un incremento de E en las plantas infectadas hasta niveles 1.42 veces superiores a los registrados en plantas control. No obstante, en las posteriores mediciones se observó que, al igual que ocurría al inicio de la infección, se producía un descenso en la tasa de transpiración de las plantas infectadas con la cepa T318, mientras que en las plantas infectadas con la cepa T385 se incrementaba. Al final del primer año los niveles de transpiración en plantas infectadas fueron similares a los obtenidos en plantas no infectadas. De forma similar, en el segundo año tras la infección tampoco se registraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de transpiración entre plantas infectadas con la cepa suave del virus y plantas control. Únicamente, 92 semanas después de la infección, se observó un descenso significativo de los valores de este parámetro en plantas infectadas.



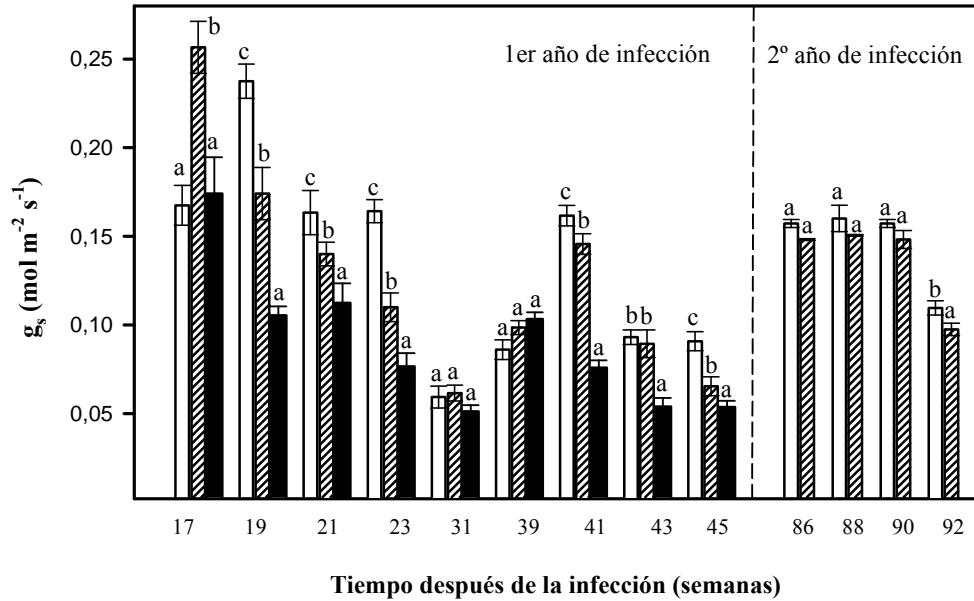
**Figura 5.7. Tasa de transpiración (E) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada barra representa la media de 48 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.3.3.3. Conductancia estomática ( $g_s$ )

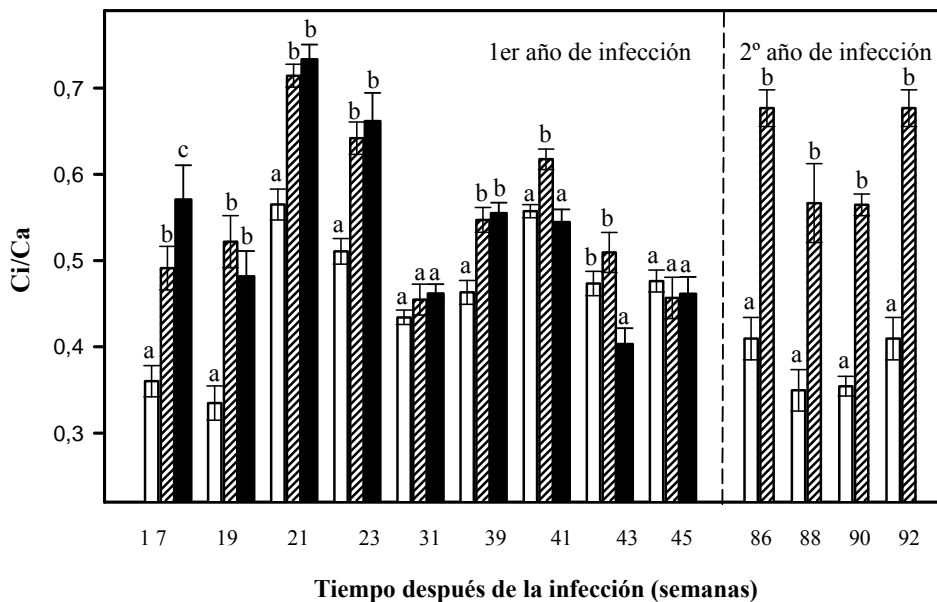
En la Figura 5.8 se muestran los valores de conductancia estomática en plantas control e infectadas con CTV, a diferentes intervalos de tiempo. Al inicio de la infección no se observaron diferencias entre plantas infectadas con el aislado agresivo del virus y plantas control. Sin embargo, en las plantas infectadas con la cepa suave se observó un acusado incremento en la conductancia estomática ( $0.26 \pm 0.01 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 1.53 veces superior al control). Este aumento fue puntual ya que en las posteriores mediciones se produjo una progresiva disminución en la conductancia estomática de hojas de plantas infectadas, proporcional a la virulencia del inóculo, con respecto a plantas control. Esta disminución fue progresiva y hacia la mitad del primer año los niveles de este parámetro en todos los grupos de plantas estudiados fueron muy similares (valores cercanos a  $0.06 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Durante el resto del año, los valores de  $g_s$  medidos en plantas control fueron significativamente superiores a los determinados en plantas infectadas; de la misma forma, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre plantas infectadas con cepas del virus de diferente virulencia, siendo las plantas infectadas con la cepa T318 las que presentaron en todos los casos valores menores. En el segundo año tras la infección, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de  $g_s$  medidos en plantas infectadas con la cepa T385 y los alcanzados en plantas control, manteniéndose en valores cercanos a  $0.15 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

### 5.3.3.4. Relación entre la concentración de $\text{CO}_2$ intracelular y ambiental ( $C_i/C_a$ )

Los resultados de  $C_i/C_a$  en plantas infectadas con CTV se muestran en la Figura 5.9. Durante los primeros meses tras la infección, se obtuvieron valores de este parámetro muy similares en plantas infectadas, con independencia de la virulencia de la cepa viral con la que fueron inoculadas. Estos valores fueron superiores a los obtenidos en plantas control desde las 17 hasta las 23 semanas después de la infección (ej. 1.30 veces superiores a las 21 semanas). Hacia la mitad del periodo experimental, los valores de  $C_i/C_a$  determinados en las plantas infectadas se igualaron a los obtenidos en las plantas control. En la segunda mitad del año, los valores correspondientes a plantas infectadas con la cepa suave siguieron siendo superiores a los obtenidos en plantas control, sin embargo se produjo una reducción paulatina en este parámetro en las plantas infectadas con la cepa severa. En el segundo año tras la infección se produjo un incremento muy importante de  $C_i/C_a$  en plantas infectadas con la cepa T385. Este incremento se mantuvo constante hasta el final del experimento. Los valores obtenidos en plantas control oscilaron entre  $0.35 \pm 0.02$  y  $0.41 \pm 0.02$  mientras que en plantas infectadas fueron significativamente superiores, registrándose valores de  $C_i/C_a$  que oscilaron entre  $0.57 \pm 0.04$  y  $0.68 \pm 0.02$ .



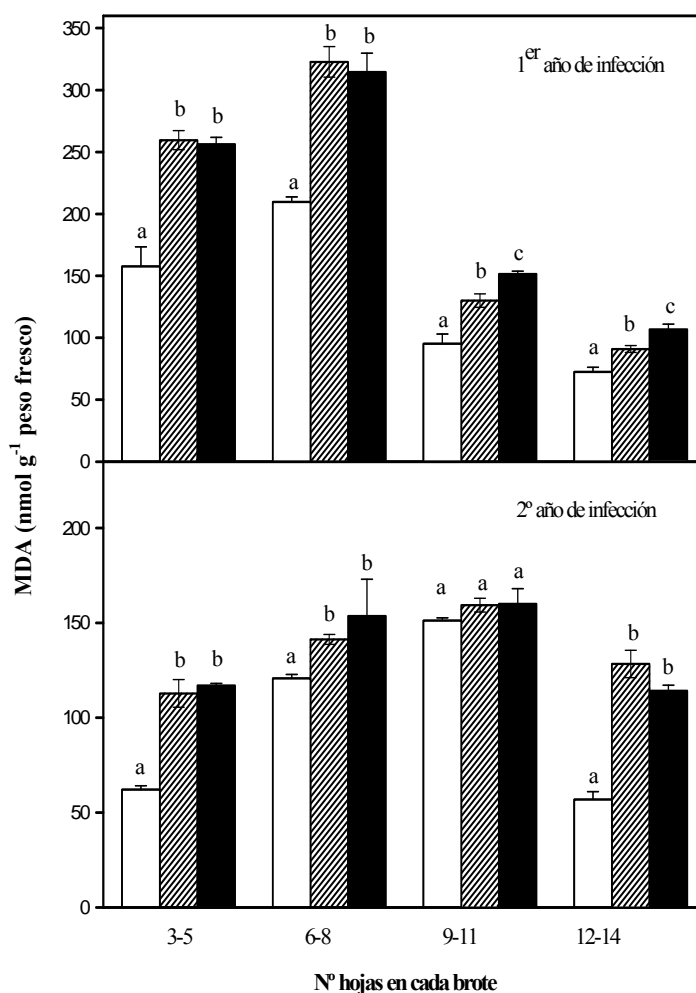
**Figura 5.8. Conductancia estomática ( $g_s$ ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada barra representa la media de 48 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 5.9. Relación entre la concentración intracelular y la ambiental de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada barra representa la media de 48 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.3.4. Estrés oxidativo

El grado de daño oxidativo generado por la infección viral en la planta se evaluó mediante la determinación de la concentración de MDA en el tejido foliar. En la Figura 5.10 se muestran los valores de MDA medidos durante el primer y el segundo año después de la infección. Durante el primer año (panel superior), el contenido de MDA en los primeros estadios de crecimiento (brotes de 3 a 5 y de 6 a 8 hojas) fue muy similar entre plantas infectadas, con independencia de la virulencia de la cepa con la que fueron infectadas, y superior al determinado en plantas control. El análisis estadístico reveló que las diferencias en el contenido de MDA entre plantas infectadas y control eran estadísticamente significativas.



**Figura 5.10. Concentración de malondialdehído (MDA) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada barra representa la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

En estadios de desarrollo posteriores se registraron concentraciones de MDA menores, tanto en plantas sanas como infectadas, a los medidos en brotes con menor número de hojas. En estas etapas de desarrollo (brotes de 9-11 y de 12-14 hojas), las plantas infectadas mostraron contenidos significativamente mayores a los determinados en plantas no infectadas. La concentración de MDA en plantas infectadas con la raza severa fue superior a la determinada en plantas infectadas con la cepa suave del virus.

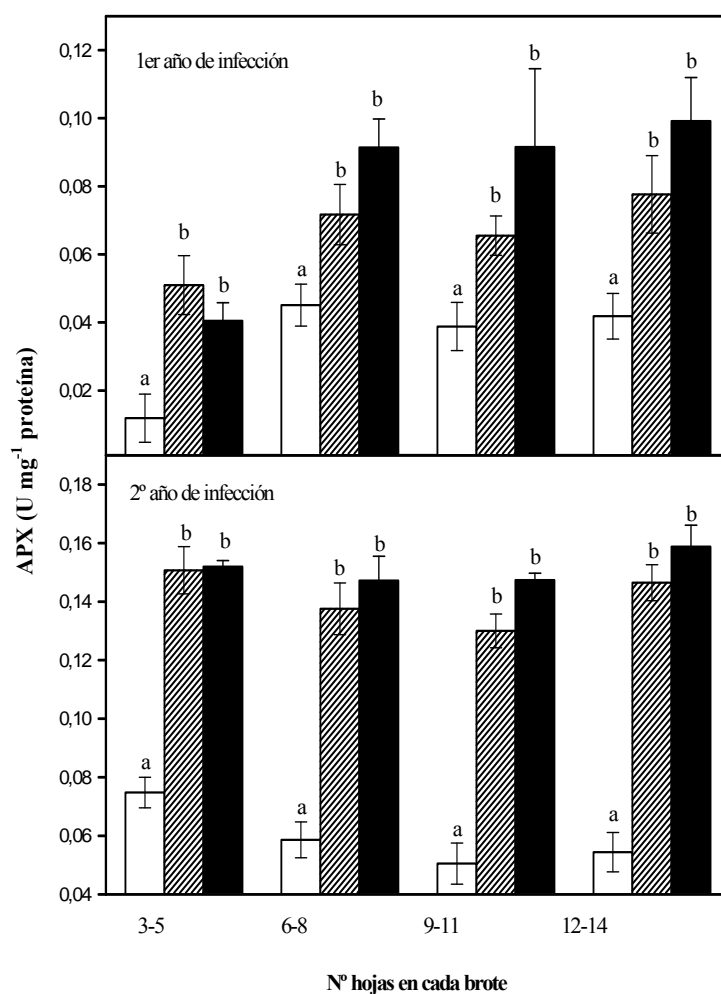
Durante el segundo año (panel inferior, Figura 5.10), y en todas las etapas de desarrollo de los brotes, las plantas infectadas exhibieron mayores concentraciones de MDA que las plantas control. Únicamente en el estadio de brotes con 9-11 hojas estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, durante este segundo año no se observaron diferencias en la concentración de MDA en función de la agresividad de la cepa del virus con que las plantas habían sido inoculadas.

### **5.3.5. Actividad de los enzimas antioxidantes**

#### **5.3.5.1. APX**

En la Figura 5.11 se representan los valores de la actividad del enzima APX medidos en plantas infectadas y en plantas control. Durante el primer año (panel superior, Figura 5.11), la infección por CTV provocó un incremento en la actividad APX en todos los estadios de crecimiento del brote, registrándose valores significativamente superiores a los medidos en plantas control. En brotes jóvenes (de 3-5 hojas) se produjo un aumento notable de la actividad de este enzima en las plantas infectadas, registrando valores 4.29 veces superiores al control en plantas infectadas con la cepa T385 y 4.28 veces superiores al control en aquellas infectadas con la cepa T318. En todos los estadios de crecimiento del brote, la actividad APX fue ligeramente superior en plantas infectadas con el aislado más virulento que con el menos virulento, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Durante el segundo año, a semejanza de lo sucedido en el primer año tras la infección, la actividad del enzima APX en plantas infectadas experimentó un aumento muy acusado en todos los estadios de desarrollo respecto a la determinada en plantas control. No obstante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad APX entre plantas infectadas, independientemente de la virulencia de la cepa viral. Esta actividad enzimática se mantuvo en niveles similares en todos los estadios del brote. Los valores de APX en plantas infectadas se mantuvieron en valores próximos a  $0.14 \text{ U mg}^{-1}$ , mientras que en las plantas control se mantuvieron en valores cercanos a  $0.05 \text{ U mg}^{-1}$ .



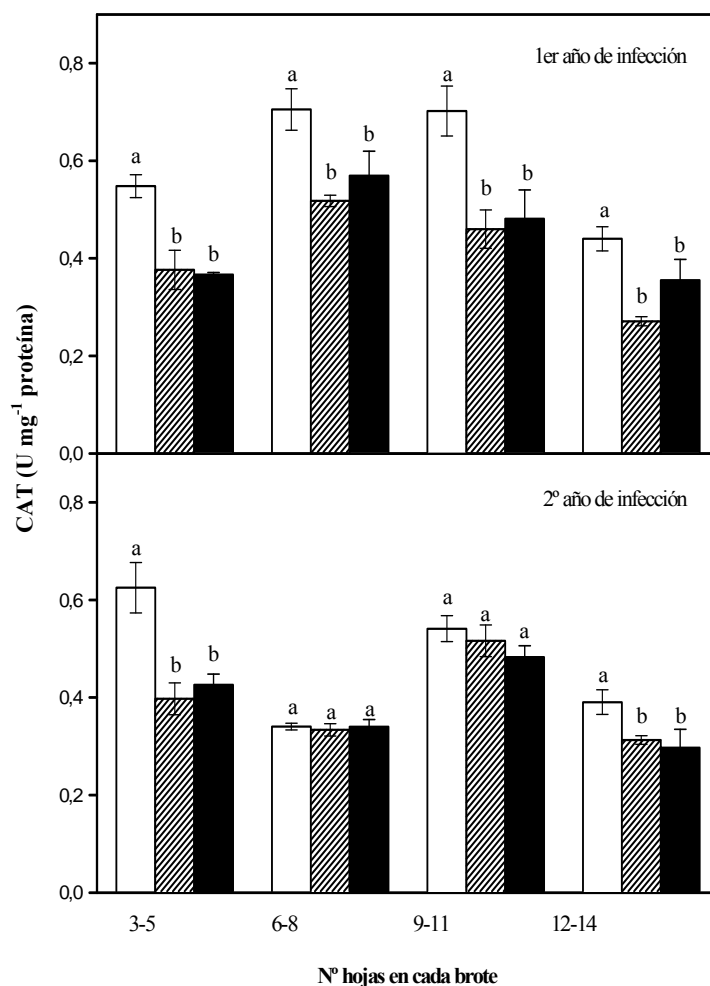
**Figura 5.11. Actividad del enzima ascorbato peroxidasa (APX) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada barra representa la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.3.5.2. CAT

En la Figura 5.12 (panel superior) se representan los valores de la actividad CAT durante el primer año de infección. En las plantas infectadas se produjo una disminución de la actividad de este enzima antioxidante respecto a las plantas control, durante todo el desarrollo del brote. En los brotes de 3-5 hojas de las plantas control los valores de CAT registrados fueron  $0.55 \pm 0.02$  U mg<sup>-1</sup> mientras que en plantas infectadas, fueron menores,  $0.38 \pm 0.04$  y  $0.37 \pm 0.04$  U mg<sup>-1</sup> para las cepas T385 y T318, respectivamente. A medida que se desarrollaba el brote se observaron ligeras diferencias en la actividad enzimática entre plantas infectadas. No obstante,

la actividad CAT fue 1.50 veces mayor en plantas control que en plantas infectadas, en prácticamente todos los estadios de desarrollo de los brotes.

En el panel inferior de la Figura 5.12 se representan valores de la actividad de este enzima antioxidante en el segundo año después de la infección. Al igual que en primer año, al inicio del crecimiento del brote (brotes de 3-5 hojas), la actividad CAT en plantas infectadas fue un 33.3 % menor al determinado en las plantas control. En este caso, los datos obtenidos de la actividad CAT en las plantas control fue de  $0.62 \pm 0.05 \text{ U mg}^{-1}$  mientras que, en plantas infectadas con la cepa suave fue de  $0.40 \pm 0.03 \text{ U mg}^{-1}$  y  $0.43 \pm 0.02 \text{ U mg}^{-1}$  en plantas infectadas con el aislado más agresivo, no se observaron diferencias significativas entre plantas infectadas con las diferentes cepas del virus.



**Figura 5.12.** Actividad del enzima catalasa (CAT) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV. Cada barra representa la media de 6 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

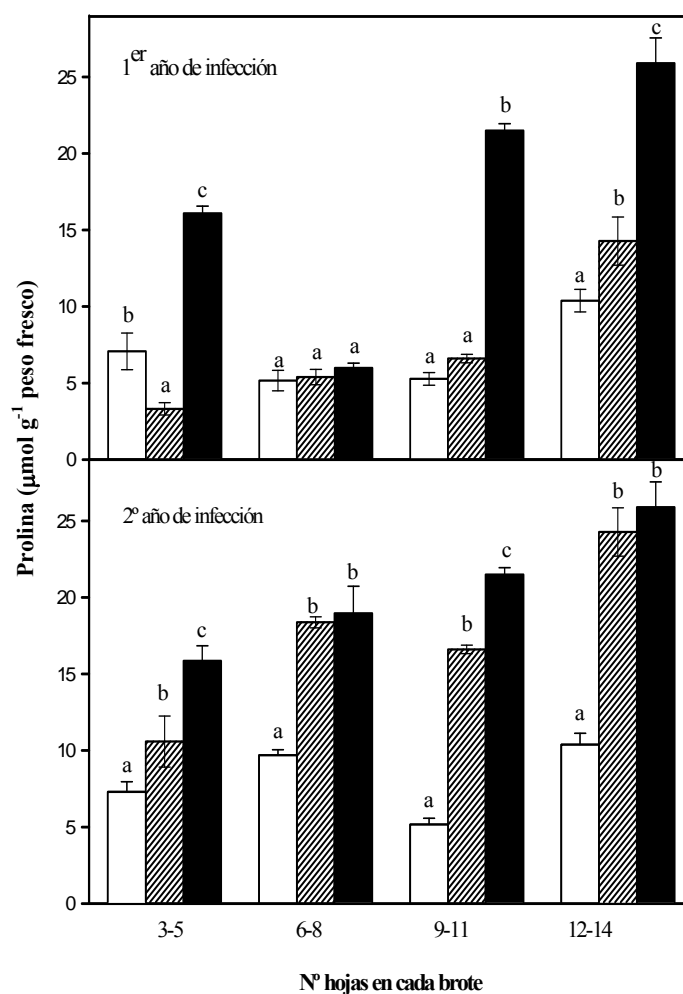
Esta pauta se mantuvo en las etapas posteriores de desarrollo del brote, determinándose en todos los casos valores de actividad menores en plantas infectadas. Después de realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre plantas infectadas con cepas de diferente virulencia.

### 5.3.6. Concentración de prolina

En la Figura 5.13 (panel superior) se representa el contenido de prolina en las nuevas brotaciones durante el primer año después de la infección. Los brotes procedentes de plantas infectadas con la cepa más virulenta acumularon mayor cantidad de prolina en las primeras etapas de crecimiento (de 3 a 5 hojas), registrándose valores significativamente superiores a los medidos en plantas control. En el mismo estadio, los brotes desarrollados en plantas infectadas con el aislado T385 presentaron concentraciones de este osmolito mucho menores. En los estadios intermedios de crecimiento, el contenido de prolina en las plantas infectadas con el aislado menos virulento aumentó ligeramente, llegando a alcanzar valores similares a los obtenidos en plantas control (valores próximos a  $5.40 \mu\text{mol g}^{-1}$  en ambos casos). Se produjo un incremento significativo del contenido de prolina en brotes de 12 a 14 hojas de plantas infectadas con la cepa T385, registrando valores de  $14.27 \pm 1.58 \mu\text{mol g}^{-1}$ , 2.34 veces superior al obtenido en plantas control. El estrés inducido por la infección con el aislado más virulento, provocó un incremento en el contenido de prolina foliar, en prácticamente todos los estadios de desarrollo del brote. Las concentraciones de prolina registradas en plantas infectadas con el aislado T318 fueron superiores, a las determinadas tanto en plantas control como en plantas infectadas con el aislado menos virulento.

En el segundo año, la pauta de acumulación de prolina foliar en plantas infectadas con el aislado menos virulento fue diferente a la observada durante el primer año después de la infección. Como se muestra en la Figura 5.13 (panel inferior), las plantas infectadas con la cepa T385 incrementaron la concentración de prolina foliar de forma acusada, mostrando valores significativamente superiores a los determinados en plantas control en todos los estadios de desarrollo de los brotes. En brotes de 6-8 hojas alcanzaron valores semejantes a los obtenidos en plantas infectadas con la cepa severa ( $18.37 \pm 0.35$  y  $18.95 \pm 1.77 \mu\text{mol g}^{-1}$ , respectivamente). A diferencia de lo observado el año anterior, estos valores se mantuvieron constantes con independencia del tamaño del brote y del aislado del virus. En los últimos estadios de desarrollo del brote (de 12-14 hojas) la concentración de prolina en plantas infectadas con la cepa T385 y T318 registraron los valores máximos de todo el periodo experimental, alcanzando valores 2.34 y 2.49 veces superiores al control, respectivamente.





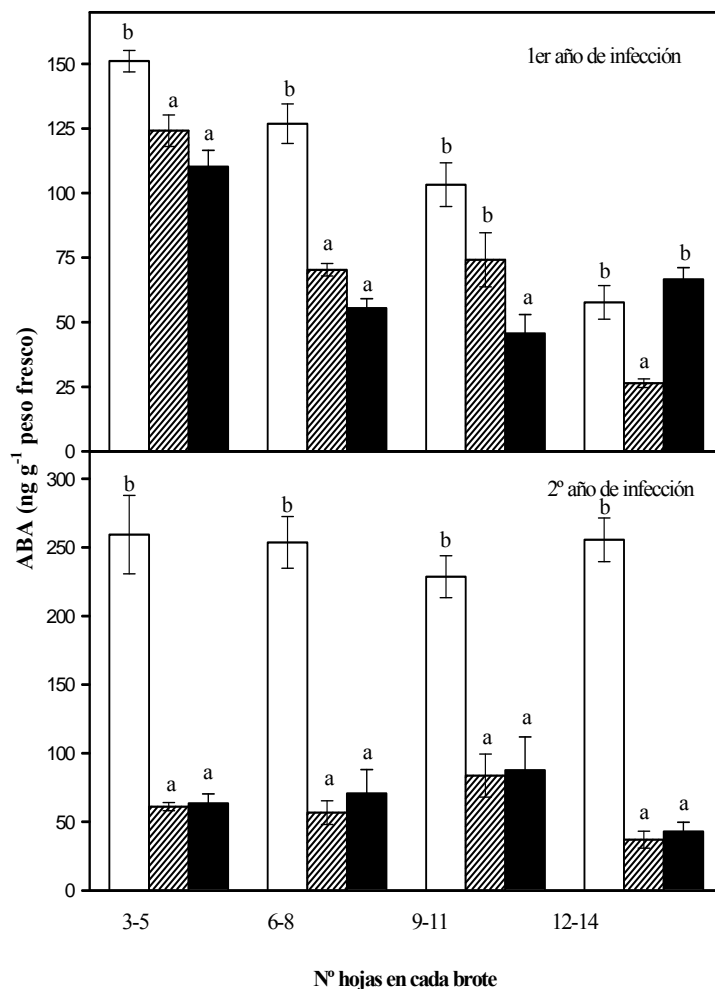
**Figura 5.13. Concentración de prolina en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada barra representa la media de 3 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 5.3.7. Concentración de fitohormonas

#### 5.3.7.1. ABA

En la Figura 5.14 se representa la evolución en la concentración de ABA en nuevas brotaciones de plantas sometidas a estrés biótico. La concentración de ABA en plantas infectadas fue menor a la medida en las plantas control, durante todo el periodo de crecimiento del brote. Se observó un descenso en la concentración de ABA en brotes jóvenes (de 3 a 5 hojas) de plantas infectadas con la cepa T318 (27.01 % menor que las plantas control). Esta diferencia aumentó en brotes un poco más desarrollados, de 6 a 8 hojas, en este caso, en las plantas infectadas con la cepa más virulenta la concentración de esta fitohormona se redujo un 56.30 %. Las plantas infectadas con

el aislado T385, también mostraron un descenso de la concentración de ABA foliar con respecto a las plantas control (valores 17.81 y 44.58 % menores en brotes de 3-5 y 6-8 hojas, respectivamente). En brotes de 12 a 14 hojas se observó un incremento en los niveles endógenos de esta hormona en plantas infectadas con la cepa agresiva del virus, manteniéndose en valores similares a los obtenidos en plantas control.



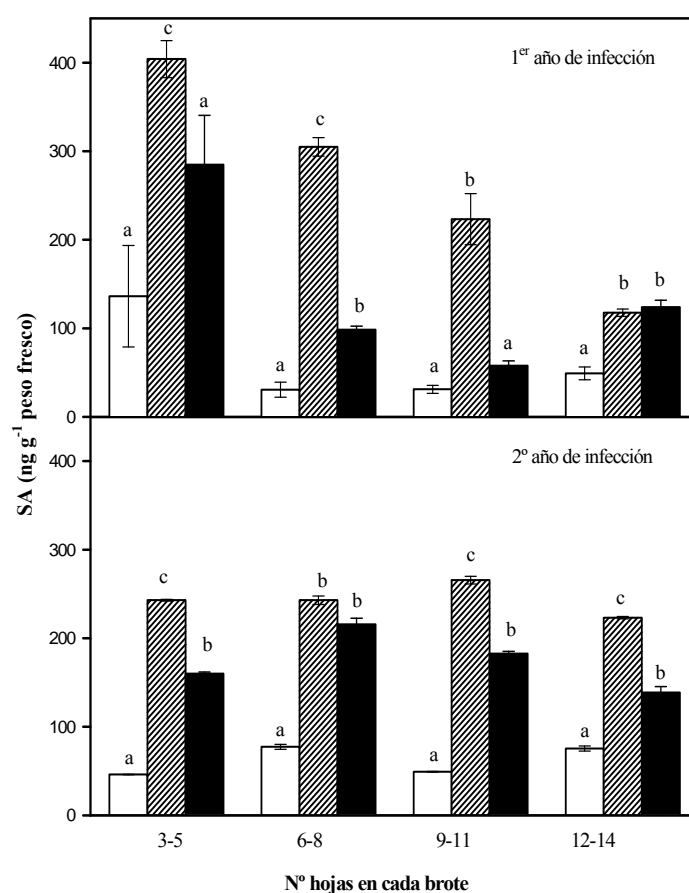
**Figura 5.14.** Concentración de ácido abscísico (ABA) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV. Cada barra representa la media de 4 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Durante el segundo año (Figura 5.14, panel inferior), la infección viral provocó, en todos los estadios de desarrollo del brote, un descenso muy acusado en el contenido de ABA endógeno foliar, con independencia de la cepa utilizada para la infección. La concentración de ABA en brotes de 3 a 5 hojas infectados fue un 76.45 % menor que la determinada en plantas control. Los niveles de ABA en plantas control se mantuvieron en valores próximos a 250 ng g<sup>-1</sup> durante

el segundo año de estudio, independientemente del tamaño del brote. En plantas infectadas con la cepa suave, el contenido de ABA fue un 85.53 % menor que el determinado en plantas control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta hormona entre plantas infectadas con los aislados T318 o T385, manteniendo valores cercanos a  $70 \text{ ng g}^{-1}$  durante todo el segundo año tras la infección.

### 5.3.7.2. SA

En la Figura 5.15 (panel superior) se representa la concentración en SA en brotes de plantas control e infectadas con diferentes cepas de CTV durante el primer año del ensayo. En brotes jóvenes (de 3-5 hojas) se observó un incremento significativo de la concentración de SA endógeno en plantas infectadas; siendo las plantas infectadas con la cepa T385 las que mostraron un mayor contenido de SA (2.97 veces superior al control). De la misma manera, en los siguientes estadios de crecimiento del brote, las diferencias en el contenido hormonal fueron estadísticamente significativas entre plantas infectadas y plantas control.



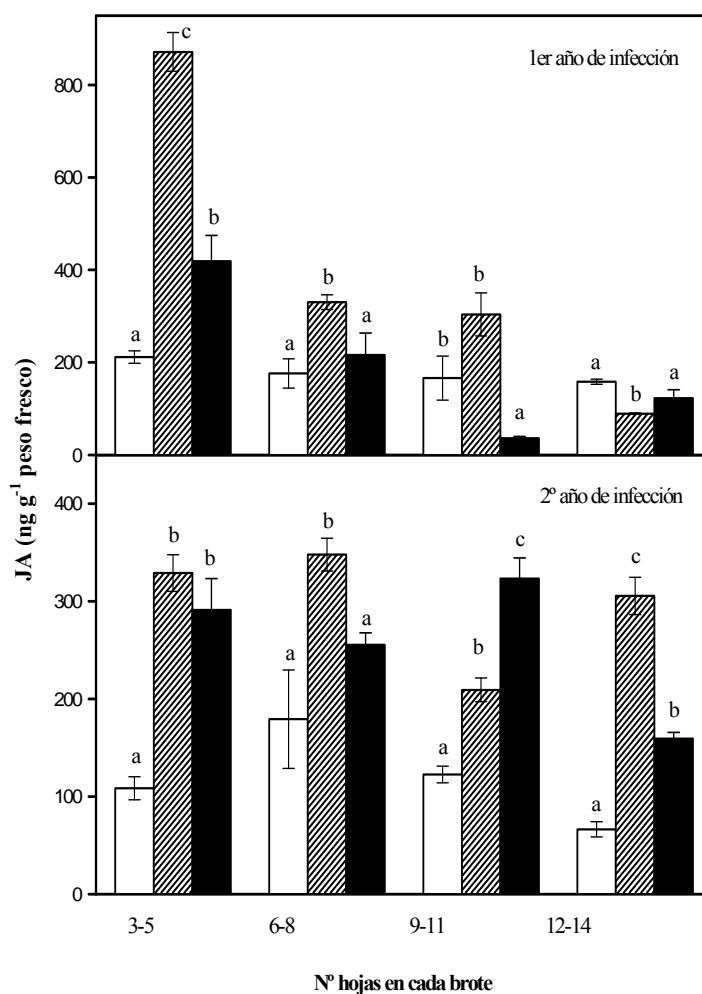
**Figura 5.15. Concentración de ácido salicílico (SA) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV.** Cada barra representa la media de 4 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Durante el segundo año (Figura 5.15, panel inferior), la concentración de esta hormona se mantuvo en niveles próximos a  $150 \text{ ng g}^{-1}$  durante todo el periodo de crecimiento del brote en plantas infectadas con la cepa T318, siendo estos valores 6.00 veces superiores a los medidos en las plantas control. En las plantas infectadas con el asilado T385 el contenido endógeno de SA fue 8.01 veces mayor al determinado en plantas control; siendo significativamente superiores a los valores obtenidos en plantas infectadas con la cepa agresiva. Tanto en plantas infectadas como en control, el contenido en SA se mantuvo constante independientemente del tamaño del brote.

### 5.3.7.3. JA

En la Figura 5.16 se representa la concentración endógena de JA en las nuevas brotaciones durante el primer año después de la infección viral. En los brotes de 3-5 hojas de plantas infectadas con la cepa agresiva, se determinaron niveles de JA superiores a los medidos en plantas control (2.09 veces mayores). Cabe destacar que el incremento en el contenido de JA en el mismo estadio de brotes de plantas infectadas con el aislado T385 fue muy acusado y transitorio. La concentración de esta hormona descendió de forma acusada en los siguientes etapas de crecimiento del brote (pasando de un contenido de JA de  $856.84 \pm 41.58 \text{ ng g}^{-1}$  en brotes de 3 a 5 hojas a  $330.29 \pm 15.99 \text{ ng g}^{-1}$  en brotes de 6 a 8 hojas). No obstante, este valor de JA fue todavía superior al valor determinado en las plantas control, durante los siguientes dos estadios de desarrollo del brote. No fue así en las plantas infectadas con la cepa T318, en este caso el contenido de JA se redujo a valores similares a valores semejantes a los medidos en las plantas control en el estadio de 12-14 hojas.

El patrón de acumulación de JA en plantas infectadas por el virus en el segundo año difiere ligeramente del observado durante el primer año tras la infección. Como se observa en la Figura 5.16 (panel inferior) la infección provocó un incremento muy acusado en el contenido de esta hormona.

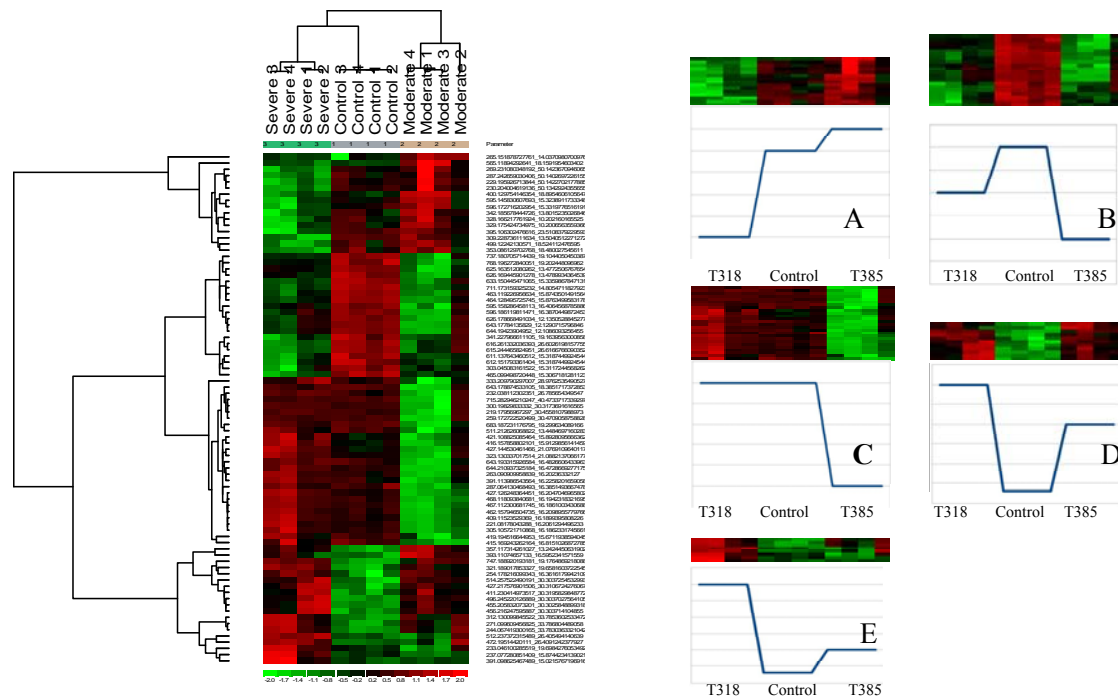


**Figura 5.16.** Concentración de ácido jasmónico (JA) en plantas de lima mejicana infectadas con CTV. Cada barra representa la media de 4 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Donde (□) indica plantas control, (▨) indica plantas infectadas con la cepa T385 y (■) indica plantas infectadas con la cepa T318. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.3.8. Metabolómica

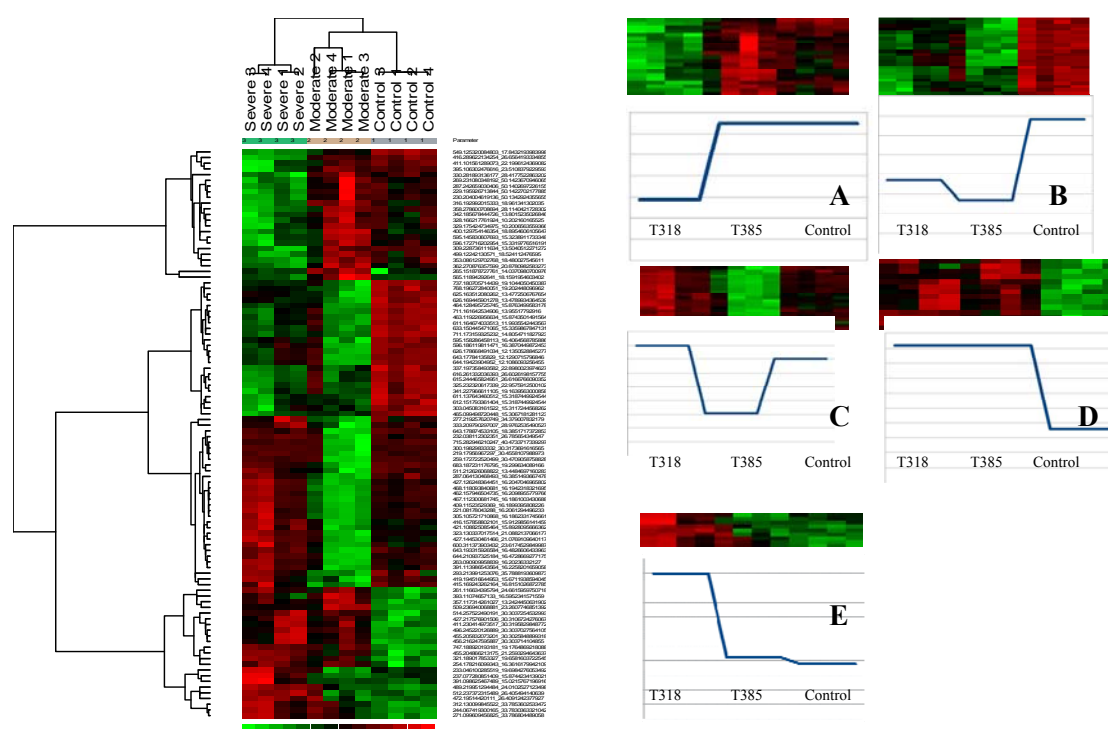
#### 5.3.8.1. Clusters

Para estudiar las variaciones en el metaboloma de plantas infectadas con CTV, se realizó un análisis metabolómico basado en LC-QqTOF-MS, tanto en plantas control, como en plantas infectadas. Se estudiaron los brotes de 3-5 hojas (Figura 5.17), 6-8 hojas (Figura 5.18), 9-11 hojas (Figura 5.19) y de 12-14 hojas (Figura 5.20). El análisis estadístico de los datos dio como resultado señales significativamente alteradas que se agrupan en clusters (representa un conjunto de señales que presentan una tendencia similar).



**Figura 5.17.** Representación gráfica de los clusters obtenidos después del análisis de varianza (ANOVA) y clustering jerárquico (HCA) del total de señales presentes en los perfiles metabólicos de brotes de lima mejicana de 3-5 hojas infectados con dos cepas de CTV: T385 (aislado suave) y T318 (aislado severo). Los colores de los clusters indican la intensidad de cada señal, siendo la roja más intensa, la verde menos intensa, pasando por la negra que tendría un valor intermedio.

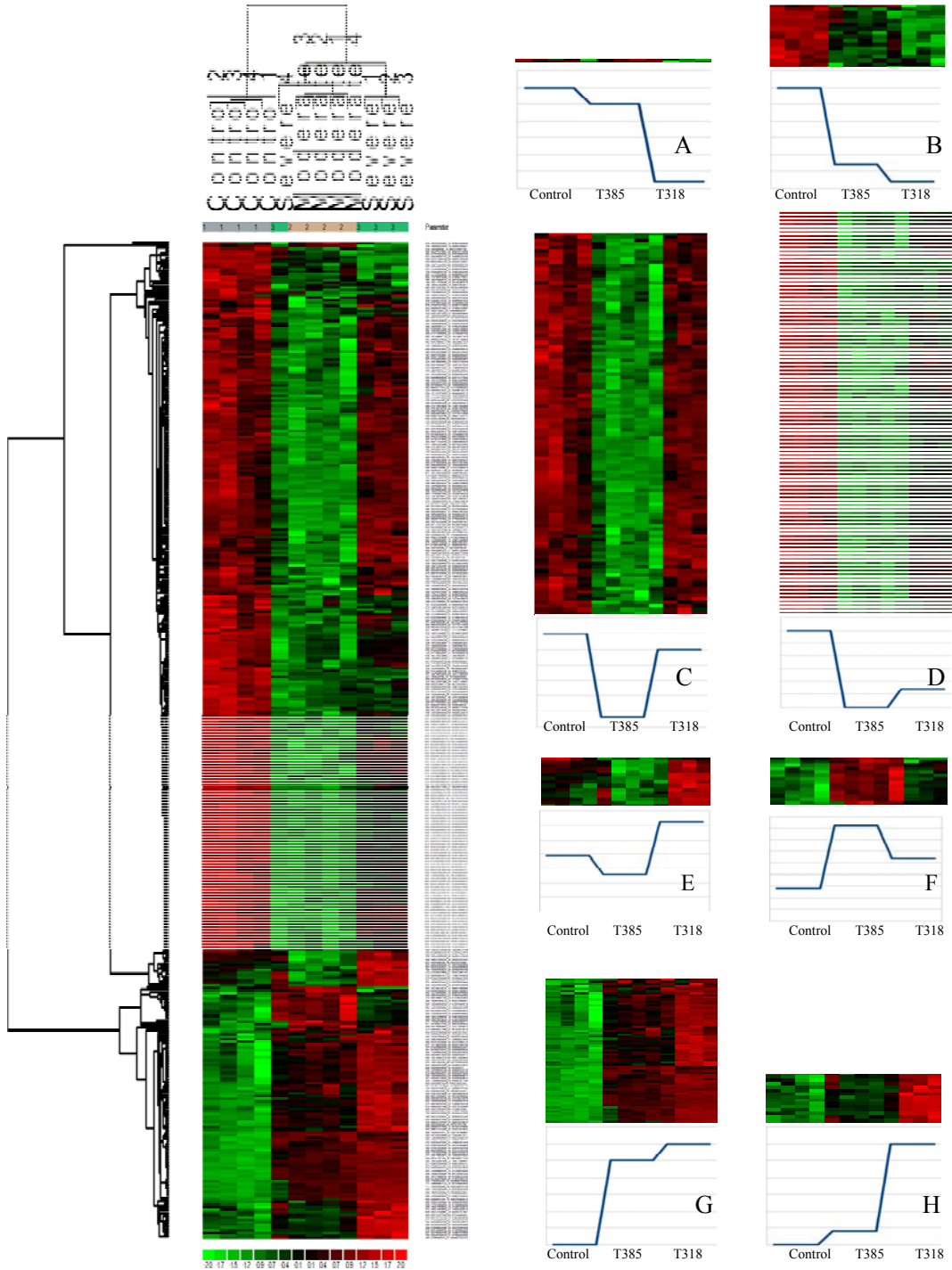
Tras realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos en brotes de 3 a 5 hojas (Figura 5.17) se obtuvieron 82 señales significativamente alteradas que se agruparon en 5 clusters. El cluster A contenía 16 señales que se reprimieron en plantas infectadas con la cepa T318 y se indujeron en plantas infectadas con la cepa T385, con respecto a las plantas control. El cluster B estaba compuesto por 20 señales ligeramente más reprimidas en plantas infectadas con la cepa suave que en plantas infectadas con la cepa severa. El cluster C, contenía 27 señales, que estaban únicamente reprimidas en plantas infectadas con T385 con respecto al control. Las 11 señales que componen el cuarto cluster D estaban inducidas en plantas infectadas con ambas cepas del virus. Finalmente, el cluster E, que contenía 8 señales, mostró una inducción mayor en el caso de plantas infectadas con la cepa severa.



**Figura 5.18.** Representación gráfica de los clusters obtenidos después del análisis de varianza (ANOVA) y clustering jerárquico (HCA) del total de señales presentes en los perfiles metabólicos de brotes de lima mejicana de 6-8 hojas infectados con dos cepas de CTV: T385 (aislado suave) y T318 (aislado severo). Los colores de los clusters indican la intensidad de cada señal, siendo la roja más intensa, la verde menos intensa, pasando por la negra que tendría un valor intermedio

El análisis estadístico de los datos obtenidos en brotes de 6-8 hojas (Figura 5.18) dio como resultado 100 señales significativamente alteradas que se agruparon en 5 clusters. Como puede verse en el cluster A con 24, los perfiles obtenidos muestran que los niveles de los metabolitos únicamente disminuyeron en plantas infectadas con la cepa T318. En el cluster B, con 23, señales se observó el mismo comportamiento para las plantas infectadas, con independencia del

inóculo, con una mayor represión en el caso de la cepa T385. El cluster C, muestra el perfil de 30 señales que disminuyeron de forma muy acusada en respuesta a la infección con la cepa menos virulenta, con respecto al control. Las 14 señales del cluster D se mostraron alteradas en las plantas infectadas con el aislado suave, aumentando considerablemente su nivel. El cluster E, muestra 9 señales que incrementaron su intensidad en respuesta a la infección con el aislado más agresivo del virus.

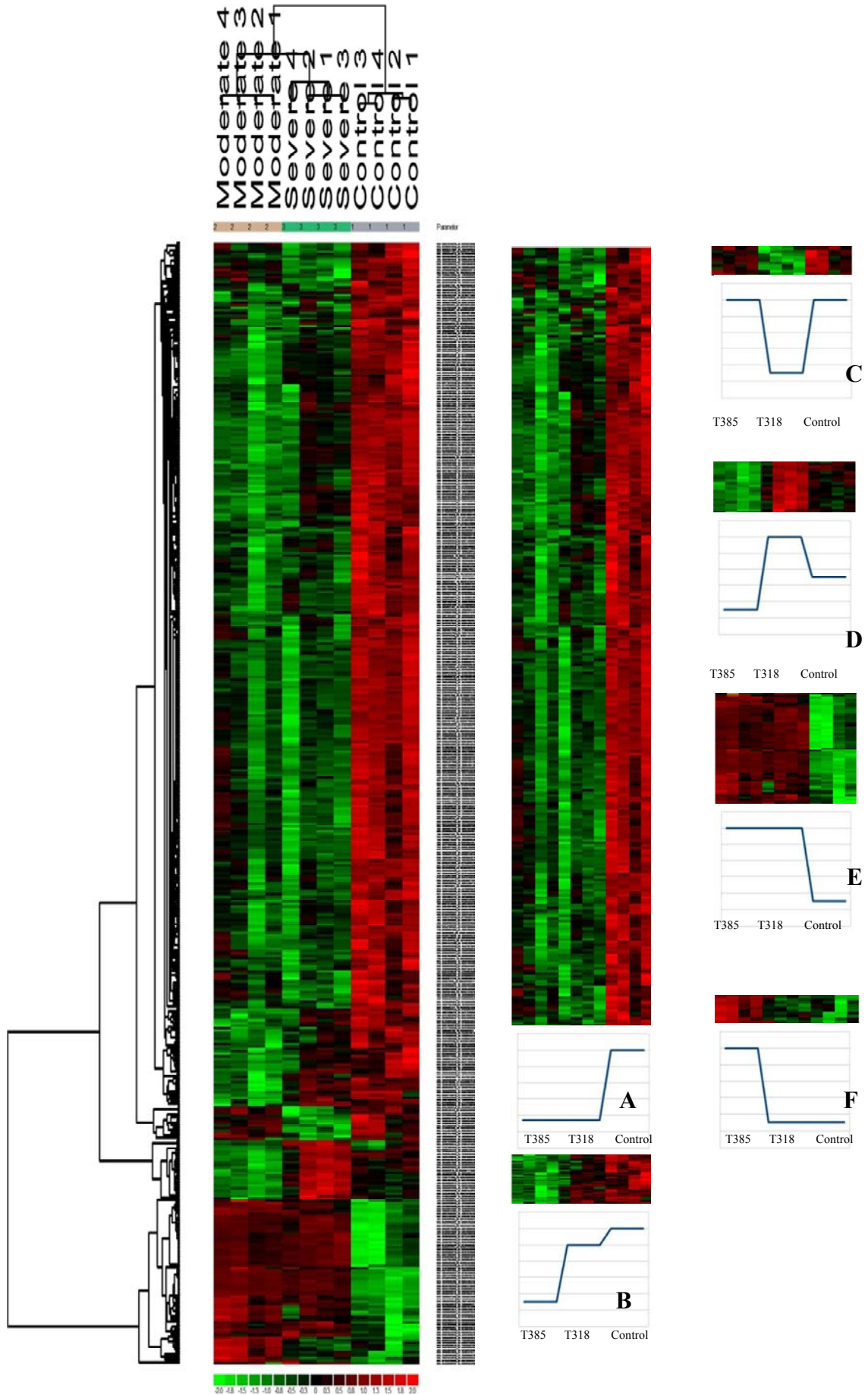




**Figura 5.19.** Representación gráfica de los clusters obtenidos después del análisis de varianza (ANOVA) y clustering jerárquico (HCA) del total de señales presentes en los perfiles metabólicos de brotes de lima mejicana de 9-11 hojas infectados con dos cepas de CTV: T385 (aislado suave) y T318 (aislado severo). Los colores de los clusters indican la intensidad de cada señal, siendo la roja más intensa, la verde menos intensa, pasando por la negra que tendría un valor intermedio

El análisis estadístico de los datos obtenidos de brotes de 9-11 hojas (Figura 5.19) dio como resultado 385 señales significativamente alteradas que se agruparon en 8 clusters. Las 2 señales que componen el cluster A estaban reprimidas en plantas infectadas con la cepa T318 del virus. El cluster B, está compuesto por 18 señales que se vieron reducidas en respuesta a la infección, independientemente de la cepa, respecto a plantas control. Las 118 señales contenidas en el cluster C y las 114 del cluster D sólo estaban alteradas en la infección por el aislado suave, en este caso, los niveles de los metabolitos disminuyeron considerablemente. En el cluster E, se agrupan 14 señales que se encuentran en los niveles más elevados en plantas infectadas con el aislado T318 respecto a plantas control mientras que en plantas infectadas con el aislado T385 estas señales estaban reprimidas. Las 16 señales que componen el cluster F sólo estaban inducidas en plantas infectadas con T385. En el cluster G, con 65 señales, se observó el mismo comportamiento para ambos grupos de plantas infectadas, con una mayor inducción en plantas infectadas con el aislado virulento. El perfil obtenido en el cluster H, con 15 señales muestra que los niveles de los metabolitos aumentaron de forma acusada en plantas infectadas con la cepa severa.

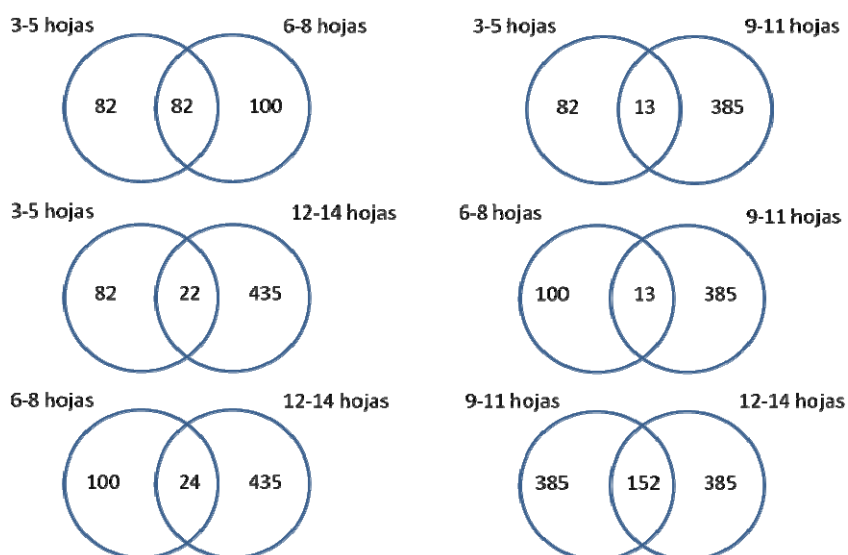
El análisis estadístico de los datos obtenidos en brotes de 12-14 hojas (Figura 5.20) dio como resultado 435 señales significativamente alteradas que se agruparon en 6 clusters. Como puede verse en el cluster A, en ambos casos las 312 señales que lo componen estaban reprimidas. Los niveles de las 23 señales que componen el cluster B disminuyeron de forma muy acusada en respuesta a la infección con la cepa menos virulenta, con respecto al control. Las 13 señales del cluster C se mostraron alteradas en la infección por el aislado más virulento, disminuyendo considerablemente su nivel. En el cluster D, los niveles de las 23 señales disminuyeron de forma muy acusada en plantas infectadas con T385 y en las infectadas con T318 aumentaron. Las 53 señales del cluster E estaban inducidas en plantas infectadas. El perfil obtenido en el cluster F, con 11 señales muestra que los niveles metabólicos aumentaron de forma acusada en plantas infectadas con la cepa T385.



**Figura 5.20.** Representación gráfica de los clusters obtenidos después del análisis de varianza (ANOVA) y clustering jerárquico (HCA) del total de señales presentes en los perfiles metabólicos de brotes de lima mejicana de 12-14 hojas infectados con dos cepas de CTV: T385 (aislado suave) y T318 (aislado severo). Los colores de los clusters indican la intensidad de cada señal, siendo la roja más intensa, la verde menos intensa, pasando por la negra que tendría un valor intermedio.

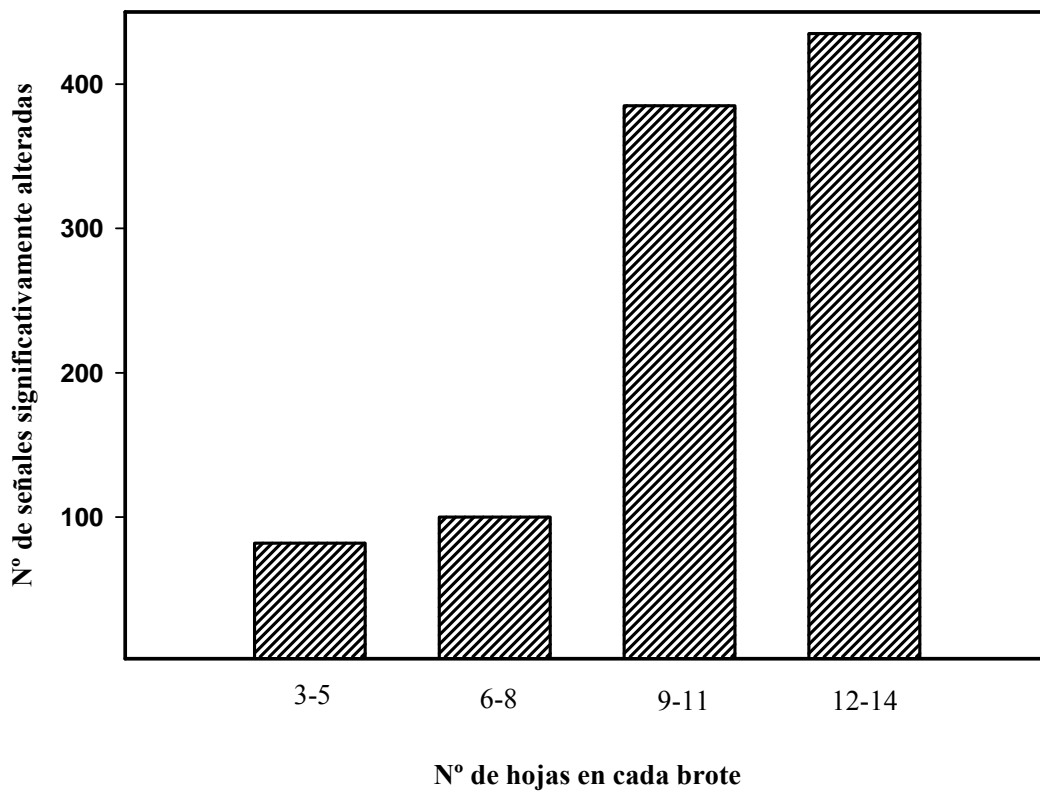
### 5.3.8.2. Señales

En la Figura 5.21 se muestran el número de señales significativamente alteradas por la infección viral en cada estadio de desarrollo del brote y aquellas comunes a cada par de tratamientos. A la vista de los diagramas de Venn, se observa que existe un mayor grado de solapamiento entre grupos de señales significativamente alteradas en estadios tempranos de desarrollo (82 señales comunes al comparar los grupos brotes de 3-5 hojas y 6-8 hojas, lo que comprende la totalidad de las señales significativamente alteradas en el primer grupo). Por el contrario, al realizar la misma comparación entre estadios tempranos y más tardíos el grado de solapamiento se reduce drásticamente (13 y 22 señales se solapan al comparar el grupo de brotes con 3-5, 9-11 y 12-14 hojas). De forma similar, al comparar las señales significativamente alteradas en el grupo de brotes con 6-8 hojas con las del grupo de brotes con 9-11 hojas solapan 13 señales y 24 con el grupo de brotes con 12-14 hojas. Finalmente, al comparar el conjunto de señales significativamente alteradas en los brotes con 9-11 y 12-14 hojas, se detectan un total de 152 señales comunes.



**Figura 5.21.** Número de señales (mz\_Rt) significativamente alteradas por la infección con CTV comunes entre los distintos estadios de desarrollo del brote de plantas de lima mejicana (brotes con 3-5 hojas, 6-8 hojas, 9-11 hojas y 12-14 hojas). El grado de solapamiento entre cada par de grupos estudiados viene representado en diagramas de Venn.

En la Figura 5.22 se resumen los resultados generados en los análisis metabolómicos, en términos de número de señales significativamente alteradas, independientemente de su comportamiento. El histograma refleja un elevado número de señales alteradas por la infección viral en los grupos de brotes con 3-5 y 6-8 hojas (82 y 100 señales, respectivamente). El número de señales alteradas por la infección con CTV fue mayor en el grupo de brotes con 9-11 hojas (384 señales) y aumentó ligeramente en el último estadio con un total de 435 señales significativamente alteradas por el tratamiento.



**Figura 5.22.** Número de señales (mz\_Rt) significativamente alteradas por la infección de CTV en brotes de plantas de lima mejcana. Realizado para cada estadio de desarrollo del brote (brotes con 3-5 hojas, 6-8 hojas, 9-11 hojas y 12-14 hojas).

## 5.5. DISCUSIÓN

Entre las enfermedades virales que afectan a los cítricos, la tristeza (causada por el CTV), es la que ha tenido una mayor repercusión a escala mundial (Cambra y Moreno, 2000; Moreno y cols., 2008). Esta enfermedad afecta a naranjos, mandarinos y pomelos injertados sobre naranjo amargo, haciendo inviable la utilización de este portainjertos en aquellas áreas citrícolas en las que la enfermedad está presente.

Muchos aislados de CTV no causan síntomas en las plantas a las que infectan, por lo que para el diagnóstico de la enfermedad es necesario llevar a cabo diferentes pruebas (biológicas, inmunológicas, moleculares, etc.). El método biológico, ampliamente utilizado, se lleva a cabo mediante el injerto de chapas de corteza sin yema de la planta que se quiere testar sobre plantas indicadoras, que en un plazo razonable de tiempo manifiestan claramente los síntomas característicos de la enfermedad. La especie lima mejicana está considerada como el mejor indicador para diagnosticar la presencia de CTV en planta. Al injertar plantas de este genotipo con chapas de corteza de árboles infectados, los síntomas que deben observarse son: clorosis de nerviaduras, hojas de menor tamaño, acucharamiento foliar, así como acanaladuras en la madera (Bar-Joseph y cols., 1981; Roistacher, 1991). La intensidad de los síntomas varía según la virulencia de la cepa. En el trabajo que se describe en esta Memoria se seleccionaron dos cepas del virus, T385 (cepa de virulencia moderada) y T318 (cepa agresiva). Se realizaron los injertos con material vegetal infectado con estos aislados. Como cabía esperar, seis meses después, el 100 % de las plantas manifestaban los síntomas descritos, siendo mucho más drásticos en el caso de la infección con T318. En plantas infectadas con esta cepa se produjo la muerte de brotes jóvenes así como de pequeñas ramas 2 años después de la infección. Los síntomas de la enfermedad en plantas infectadas son, al menos en parte, consecuencia del efecto del CTV en los vasos conductores y sus células acompañantes, que al perder turgencia, se aplastan produciendo hipertrofia de las células del parénquima (Schneider, 1959). Por otra parte, en las interacciones patógeno-planta, se produce la formación de lignina y consiguiente endurecimiento de la pared celular (Baker y Orlandi, 1995).

Los procesos fotoprotectores y fotoinhibitorios juegan un papel fundamental en la respuesta de las plantas a cualquier tipo de estrés (Rahoutei y cols., 2000). Aunque es generalmente aceptado que la magnitud de los daños que la planta sufre a nivel del PSII como consecuencia del estrés varía en función de la especie vegetal y principalmente, de la severidad del estrés (Medrano y cols., 2002), los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que no existen diferencias en los parámetros de fluorescencia estudiados en plantas de lima mejicana infectadas con las cepas suave o agresiva de CTV.

La eficiencia fotoquímica del PSII, expresada como la relación  $F_v/F_m$ , es un parámetro muy estable entre las especies vegetales y se sitúa en valores cercanos a 0.8 en condiciones óptimas

(Björkman y Demming-Adams, 1987). En plantas infectadas con CTV se observa un descenso en este parámetro respecto a dicho valor que indica que está teniendo lugar un proceso de fotoinhibición (Osmond y cols., 1999). El  $\Phi_{\text{PSII}}$  mide la proporción de energía absorbida por el PSII (Genty y cols., 1989) que se utiliza en el transporte electrónico fotosintético, y suele ser directamente proporcional a la tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  (Bilger y Björkman, 1990). En respuesta al estrés biótico provocado por CTV, los valores de  $\Phi_{\text{PSII}}$  de plantas infectadas fueron menores a los registrados en plantas control. Varios autores han observado que, en condiciones de estrés, las reducciones en  $\Phi_{\text{PSII}}$ , vienen asociadas a un aumento en NPQ (López-Climent y cols., 2008; Osmond y cols., 1999), lo que sugeriría un intento de disipación del exceso de energía. El hecho de que la infección por CTV no provoque un aumento en los valores de NPQ podría indicar que la planta está ajustando el flujo de electrones fotosintéticos a una menor actividad del sistema.

La inhibición del transporte electrónico fotosintético observada en plantas infectadas por virus ha sido atribuida, bien a la interacción de algún componente viral con los distintos elementos del PSII (Banerjee y cols., 1995; 1999), o bien a un descenso en los niveles de proteínas constituyentes del PSII (Lehto y cols., 2003). La disminución del número de centros funcionales se relaciona con la integridad de la maquinaria fotosintética (Flexas y Medrano, 2002) y podría estar asociada con la llamada fotoinhibición (Osmond y Grace, 1995). Aunque existen pocos estudios del daño directo ocasionado, diversas evidencias sugieren que estreses severos podrían causar daños en la maquinaria implicada en el transporte de electrones (Araus y cols., 1998). Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que no existen daños directos sobre el fotosistema, al menos a nivel de la antena, ya que no se observa un incremento de  $F_0$ . Por tanto, no parece que exista una reducción en la eficiencia de los complejos de captación de luz. En términos generales, la disminución de la tasa del transporte electrónico suele ser de menor magnitud que la caída de la tasa fotosintética (Flexas y cols., 1998). Esto sugiere que otros procesos, distintos a la asimilación de  $\text{CO}_2$ , se convierten en destinos alternativos de electrones (Lawlor, 2002).

La medida registrada por un analizador de gases con detector de infrarrojos (IRGA) portátil permite estudiar gran cantidad de parámetros para determinar la eficiencia fotosintética y evaluar el efecto de un determinado factor de estrés sobre la misma. Otra ventaja de esta técnica es que es precisa, no destructiva y de gran rapidez en las medidas (Lichtenthaler, 1996). La disminución de la fotosíntesis en plantas infectadas por patógenos es un fenómeno bien documentado en plantas herbáceas (Goodman y cols., 1986; Ma y Ptashne, 1987; Zaitlin y Hull, 1987); así ocurre en el caso de los ácaros (Lin y cols., 1999), hongos (Sholes y cols., 1994) y virus (Balachandran y Osmond, 1994; Balachandran y cols., 1994; 1997b; Osmond y cols., 1999; Rahoutei y cols., 2000). Los resultados descritos en esta Memoria muestran que, la infección por CTV desencadenó una disminución de la tasa fotosintética en plantas de lima mejicana independientemente de la agresividad de la cepa viral. No obstante, los mecanismos

concretos a través de los cuales los virus inhiben la fotosíntesis de la planta huésped son en gran parte desconocidos.

La infección viral puede llegar a afectar procesos que controlan la asimilación de CO<sub>2</sub> como los de apertura estomática o difusión en el mesófilo (Sampol y cols., 2003). En plantas infectadas por CTV se observó una disminución en A, a pesar de aumentar la disponibilidad de CO<sub>2</sub> en las células subestomáticas (C<sub>i</sub>). De esto se deduce que la difusión y disponibilidad de CO<sub>2</sub> no es la causa fundamental de la inhibición de la fijación de CO<sub>2</sub> observada, sino que los factores no estomáticos son los que ejercen una mayor influencia sobre la reducción en la tasa fotosintética.

Para algunos autores (Dawson y Hilf, 1992) la interferencia de ciertos componentes virales con procesos tales como la síntesis o el transporte de proteínas del PSII en el cloroplasto y/o del ciclo de Calvin-Benson codificadas en el núcleo, podría ser el mecanismo responsable de las alteraciones en el cloroplasto durante el proceso de infección viral y, por lo tanto, el estrés inducido por virus produciría en la planta efectos a diversos niveles. Tal y como se ha indicado arriba, en este trabajo se observó que el descenso en A ocurría de forma paralela a un incremento de C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>. Esto junto a los descensos concomitantes en F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub> y Φ<sub>PSII</sub>, redundaría en las evidencias que indican que las limitaciones en la actividad fotosintética inducidas por CTV en cítricos se deben más a una reducción en la eficiencia carboxilativa que a una limitación en la difusión de CO<sub>2</sub> a través del estoma. Se ha detectado que en las plantas infectadas se producen graves alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y en su transporte a través del floema (Hull, 2002). Ello podría afectar la expresión génica y rutas metabólicas del huésped y llevar a una síntesis deficiente de complejos, enzimas y pigmentos fotosintéticos en la planta infectada (Balachandran y cols., 1997a; Havedla y Maule, 2000; Herbers y cols., 2000).

La falta de activación de un mecanismo de disipación de la energía en un sistema fotosintético defectuoso puede llevar a la aparición de daño oxidativo. Este parece ser el caso del sistema aquí descrito, tal y como sugiere la falta de incremento en el parámetro NPQ y se confirma con la acumulación de MDA. Los daños producidos en los componentes celulares pueden conducir a una pérdida o disminución de su función (Levine y cols., 1994; Sgherri y cols., 2000) si el daño no es reparado. Los resultados presentados indican que el daño provocado por el virus en las plantas se intensificó con el tiempo de infección. El daño oxidativo inducido por las dos cepas del virus fue similar independientemente de su agresividad.

El estrés oxidativo puede entenderse como una situación en la que se observa un aumento en la velocidad de producción de especies oxidantes o una disminución en la actividad de las defensas antioxidantes, resultando en un aumento sostenido de las concentraciones de ROS. Hoy en día, se interpreta la actividad antioxidante no sólo como el proceso de atrapar ROS, sino que incluye los mecanismos que evitan la formación de estas especies reactivas de oxígeno,

junto con los procesos de reparación y eliminación de los productos de oxidación, por lo que resulta de gran importancia la evaluación de todos ellos en conjunto.

La actividad APX en todos los estadios de desarrollo de los brotes, y de plantas infectadas durante 2 años consecutivos, experimentó un incremento en respuesta al estrés biótico, lo que indica que la maquinaria responsable de la eliminación de  $H_2O_2$  no sufrió ningún daño como consecuencia del estrés. El enzima APX presentó una activación más intensa y temprana durante el segundo año tras la infección, que se mantuvo durante todo el crecimiento del brote para las plantas de lima infectadas con independencia de la cepa de CTV con que estaban inoculadas. Por otra parte, los datos muestran que la actividad CAT disminuyó de forma significativa, especialmente durante el primer año de infección. Esto difiere con estudios realizados en hojas de *Cucurbita pepo* infectadas por virus en donde se produjo la activación tanto de APX y como de CAT (Radwan y cols., 2006). En nuestro caso, el estrés inducido por CTV provocó un importante aumento de la actividad APX, mientras que la actividad CAT no se vio alterada en las plantas infectadas. Esto puede ser debido a que el daño está localizado en los cloroplastos (orgánulo en donde se activa el APX) mientras que el enzima CAT se localiza en los peroxisomas y está ausente en los cloroplastos (Díaz-Vivancos y cols., 2006; Singh y cols., 2010). Por tanto, el estudio de la actividad enzimática indica una cierta capacidad de detoxificación de  $H_2O_2$  en las plantas de lima infectadas con las dos cepas CTV, con independencia de la agresividad del virus. Sin embargo, la existencia de acumulación de MDA en plantas infectadas indica que parte de las ROS escaparían del sistema de detoxificación, como consecuencia de la presión continua que ejerce el estrés, y provocarían el incremento en la peroxidación lipídica.

En las interacciones patógeno-planta es bien conocida la implicación del  $H_2O_2$  en la formación de lignina y consiguiente endurecimiento de la pared celular (Carver y cols., 1994; Mauch-Mani y Slusarenko, 1996; Mörschbacher y cols., 1990) fenómeno que se observa en el nervio central y nerviaciones secundarias de las hojas de lima mejicana infectadas por CTV durante el segundo año tras la infección. La lignina se forma por la polimerización y deshidrogenización de precursores producidos en la vía metabólica de fenilpropanoides involucrados en la respuesta de defensa frente a patógenos (Vance y cols., 1980). En cuanto a su función durante la respuesta de defensa, es sabido que el  $H_2O_2$  dispara sistemas protectores celulares endógenos del hospedador, limitando el tamaño de la lesión.

Los resultados expuestos en esta Memoria muestran un incremento de la concentración de prolina foliar en las plantas de lima mejicana infectadas con el virus de la tristeza de los cítricos. El incremento de la concentración de este osmolito compatible también ocurre en plantas de cítricos sometidas a estrés salino (Arbona y cols., 2003; 2005; Gómez-Cadenas y cols., 1998) y por inundación (Arbona y cols., 2008) y se ha descrito también en otras especies vegetales,



como tomate (Claussen, 2005) y judía (Türkan y cols., 2005), entre otras. En el caso de plantas de lima infectadas con el aislado agresivo de CTV, el incremento de prolina tuvo lugar desde el primer año después de la infección, mientras que en las plantas infectadas con el aislado suave del virus fue durante el segundo año cuando aumentaron los niveles de este osmolito compatible de forma estadísticamente significativa respecto al control. Esto podría indicar que la prolina se acumula en la planta en función de la presión que el estrés ejerce sobre ella. Las funciones atribuidas a la prolina son principalmente tres: (i) osmorregulador (Gómez-Cadenas y cols., 1998; Molinari y cols., 2004); (ii) detoxificador de ROS (Arbona y cols., 2008; Okuma y Murata, 2004; Türkan y cols., 2005) y, (iii) estabilizador de las membranas celulares (Hamilton y Heckathorn, 2001; Hare y cols., 1998). Los datos muestran que, la acumulación de prolina en plantas infectadas con el aislado agresivo fue mayor que en plantas infectadas con el aislado suave, lo que indica que, a mayor estrés la acumulación de prolina es mayor. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Claussen (2005) que afirma que cuanto más fuerte es el estrés, más rápidamente se estimula la síntesis y acumulación de prolina en los tejidos de la planta infectada. Además, descartan una posible función efectiva de la prolina como detoxificador de ROS ya que la mayor concentración de MDA coincide con el mayor aumento en los niveles de prolina.

El ABA se sintetiza en bajas cantidades en casi todas las células que contienen cloroplastos o amiloplastos, en especial en tejidos vasculares no sometidos a estrés, distribuyéndose a continuación, a todos los órganos y tejidos (Jordan y Casaretto, 2007). Contrariamente a lo descrito por otros autores (Ruíz-Medrano y cols., 2001), los datos expuestos en esta Memoria muestran que el contenido de ABA en plantas infectadas fue menor al medido en las plantas no estresadas, durante todo el experimento, independientemente de la virulencia de la cepa del virus con que habían sido infectadas. Esto puede ser causado por una disminución del transporte de ABA desde la parte radicular hacia la parte aérea de la planta (Else y cols., 2001) debido a que el virus afecta el transporte a nivel de floema. El ABA es transportado por vía floemática y xilemática a brotes, raíces, y también a las células de parénquima fuera de los haces vasculares, aumentando su concentración en condiciones de estrés en estas vías. La magnitud de este cambio depende de las especies (Taiz y Zeiger, 2006). El CTV afecta a los vasos conductores y células acompañantes, produciendo hipertrofia de las células parenquimáticas (Schneider, 1959) y esa puede ser la razón por la cual se acumula menos ABA en el tejido foliar de las plantas infectadas. No obstante, el ABA se sintetiza también de forma masiva en las hojas (Gómez-Cadenas y cols., 1996; ver Capítulo 3), por tanto sería interesante completar el trabajo mediante estudios moleculares sobre genes de síntesis y catabolismo de ABA para tener una visión más completa de las causas de la reducción de los niveles foliares provocados por la infección del virus.

Otra respuesta observada en trabajos previos es un menor crecimiento de la parte aérea de plantas infectadas en relación a la raíz (Durán-Vila y Moreno, 2000). En el sistema experimental aquí descrito, se produjo una reducción significativa del tamaño de las plantas infectadas con la cepa más agresiva de CTV, aproximadamente un 70 % con respecto al control mientras que en las plantas infectadas con la cepa suave la disminución fue del 40 % durante el primer año. Los datos parecen descartar una influencia del ABA en la ralentización del metabolismo vegetal y el descenso del crecimiento de las plantas debería relacionarse con el menor flujo de fotoasimilados debido al deterioro floemático provocado por la infección del virus (Taiz y Zeiger, 2006).

Como respuesta al ataque de patógenos, se activan numerosos genes cuyos productos degradan la pared celular de bacterias u hongos, destruyen células infectadas, etc. Además se activa la respuesta sistémica adquirida por vía del SA (Vlot y cols., 2009). Esta inducción no ocurre sólo en el tejido inicialmente infectado, sino en hojas y otros tejidos no expuestos al patógeno gracias a señales que son transportadas a través del floema (Ruíz-Medrano y cols., 2001). Los resultados descritos en este Capítulo concuerdan con estos trabajos puesto que se observó una acumulación de SA en el tejido foliar en respuesta a la infección por CTV. Trabajos anteriores sugieren que el SA actúa como potenciador de la respuesta de defensa ya que inhibe la actividad de los enzimas CAT y APX, aumentando la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Abramovitch y cols., 2006; Horváth y cols., 2007; Palma y cols., 2009). No obstante, los datos obtenidos en el estudio del efecto del virus en plantas de cítricos no confirman que exista dicha correlación. Después de la infección de CTV, se produjo un incremento en el contenido de SA, a su vez, la actividad APX también aumentó mientras que la actividad CAT disminuyó.

Estudios previos demuestran que cuando se produce un daño en la pared celular, aumentan los niveles endógenos de JA (Creelman y cols., 1992; Farmer y cols., 2003) e inducen la activación de diversos genes inhibidores de proteasas y de la vía de los fenilpropanoides (CHS, PAL, HMGR) (Dittrich y cols., 1992). Estos genes dan lugar a la síntesis de fitoalexinas, compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se sintetizan y se acumulan en las plantas después de la exposición a microorganismos. Los resultados descritos en esta Memoria, indican que se produce un aumento muy acusado en los niveles de JA en brotes jóvenes al inicio de la infección, lo que puede dar cuenta de una respuesta activa de la planta frente al patógeno y sugiere que el JA podría tener un papel como mediador entre la percepción del estrés y la estimulación de las respuestas fisiológicas (Anderson y cols., 2004; Devoto y Turner, 2005).

El JA al igual que cualquier otra hormona, no participa de forma aislada en la activación de los procesos que regula, sino que lo hace interaccionando con otras moléculas señalizadoras. Se ha descrito un amplio número de interacciones entre los jasmonatos y otras rutas de señalización hormonal como las de etileno, SA, auxinas o ABA (Flors y cols., 2008; Rojo y cols., 2003;

Turner y cols., 2002). En el presente trabajo se describe una correlación en la acumulación de JA y SA en plantas de lima infectadas con CTV, durante todo el periodo experimental a la vez que se observa una disminución de ABA. Aunque existen numerosos ejemplos en plantas de tomate y tabaco sobre interacciones entre SA y JA en la señalización de los mecanismos de defensa, aún faltan por elucidar los componentes implicados y la forma en que estas interacciones se llevan a cabo (Li y cols., 2004). Se ha puesto de manifiesto que el ABA puede actuar como regulador positivo en la resistencia a enfermedades a través de la potenciación de la deposición de calosa (Mauch-Mani y Mauch, 2005; Ton y Mauch-Mani, 2004; Ton y cols., 2005). Sería interesante, en estudios posteriores, analizar si la hipersensibilidad de lima mejicana al CTV está relacionada con el importante descenso en los niveles de ABA determinados en este trabajo. El estudio de la concentración endógena de ABA en genotipos de cítricos tolerantes a la infección permitiría esclarecer el papel del ABA en cítricos infectados por CTV.

La infección por CTV provocó importantes cambios en el metabolismo de plantas de lima y se detectaron un gran número de señales significativamente alteradas en todos los tratamientos. En estudios realizados para analizar las variaciones en el metaboloma de raíces de cítricos en respuesta a estrés por inundación, no se obtuvieron tantas señales (datos no publicados) como en respuesta a la infección por virus.

El análisis estadístico de los perfiles metabolómicos reveló un gran número de señales significativamente alteradas por la infección viral en los brotes con 3-5, 6-8, 9-11 y 12-14 hojas, con el mayor número de señales recogidas en este último grupo. En este sentido, se observó un salto cuantitativo y cualitativo en las señales alteradas entre los estadios más tempranos (3-5 y 6-8 hojas) y los estadios tardíos (9-11 y 12-14 hojas). Los grupos de brotes en estadios más tempranos presentaron un número relativamente moderado de señales significativamente alteradas por la infección con CTV (82 y 100, respectivamente) con un elevado grado de solapamiento entre ellos. Por el contrario, los estadios más tardíos presentaron un elevado número de señales alteradas (384 y 435, respectivamente) con un relativamente bajo grado de solapamiento entre ellos (39.5% y 34.9% en brotes con 9-11 y 12-14 hojas, respectivamente). Esto podría indicar, por un lado un incremento en la capacidad de respuesta del metabolismo secundario a medida que el brote se va desarrollando al mismo tiempo que los metabolitos inducidos adquieren mayor especificidad, de ahí el bajo grado de solapamiento. Este hecho está posiblemente relacionado con la carga viral de los brotes. Las partículas virales se transportan a los tejidos vegetales a través de los vasos conductores. Por tanto, cuanto mayores son los brotes mayor es el grado de desarrollo de los vasos conductores y también la eficiencia de transporte de las partículas virales.

Los perfiles descritos en respuesta a la infección viral indican que el efecto que el CTV ejerció sobre el metabolismo secundario de las plantas de lima mejicana fue principalmente inhibitorio. En la Figura 5.17 (brotes de 3-5 hojas), los clusteres A, B y C (64 señales) son representativos del claro efecto inhibitorio, independientemente de la cepa viral, frente a 19 señales inducidas (representadas por los clusteres D y E). De forma similar, en la Figura 5.18 se observaron 77 señales significativamente reducidas, así como en la Figura 5.19 se observaron (A+B+C+D) señales reducidas respecto de valores control y en la Figura 5.20, un total de 348 señales.

Examinando los perfiles, se observó también un claro efecto diferencial entre las dos cepas del virus indicando que los perfiles de metabolitos secundarios no sólo responden a la infección *per se* sino que la agresividad de la cepa es también un aspecto clave. Contrariamente a lo que se podría esperar, la infección con la cepa T318, más agresiva, no ejerció, de forma generalizada, un efecto más drástico respecto al número de señales significativamente alteradas en comparación con la cepa más suave. Al contrario, el efecto de ambas cepas sobre el metabolismo secundario fue bastante similar, difiriendo únicamente en el tiempo que tardó en provocar la muerte de las plantas infectadas. En el caso de la infección con el aislado T318 tuvo lugar un año después de la infección, mientras que la inoculación con la cepa más suave permitió a las plantas sobrevivir un año más, aunque mostrando graves síntomas. No obstante, como se ha comentado anteriormente, a nivel metabolómico se pudieron identificar clusters de respuesta específica a cada uno de los aislados de CTV en todos los grupos de brotes analizados, lo cual indica que existe una respuesta específica, dentro del abanico de metabolitos secundarios, a cada uno de los aislados, dependiendo de su agresividad.

A la vista de los prometedores resultados obtenidos en este estudio, el siguiente paso para completar el análisis metabolómico sería la identificación de las distintas señales que permitirá su anotación fisiológica y funcional.

## **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

- ❖ El cultivo *in vitro* supone una alternativa efectiva y versátil para el estudio de las respuestas de los cítricos a condiciones de estrés hídrico y salino.
- ❖ Las plantas de cítricos cultivadas *in vitro* mantienen su maquinaria antioxidante intacta incluso cuando se cultivan brotes aislados. De forma similar, estas plantas son capaces de acumular prolina y activar señales hormonales frente al estrés osmótico y salino.
- ❖ El estrés osmótico provoca un aumento de la presión oxidativa en hojas de cítricos que se traduce en un estrés oxidativo independientemente de la presencia de raíces. Sin embargo, la elevada salinidad en el medio de cultivo no provoca daño oxidativo en brotes cultivados en ausencia de raíz, probablemente porque el sistema antioxidante no se ve desbordado.
- ❖ Las plantas de tres genotipos de cítricos (MC, CC y CIT) con distinta sensibilidad al estrés salino, cultivadas *in vitro* desprovistas del sistema radicular acumulan cantidades similares de Cl<sup>-</sup> en hojas.
- ❖ El ABA se confirma como señal clave en las respuestas de los cítricos al estrés osmótico, tanto en el sistema radicular como en la parte aérea. Sin embargo, en ausencia del sistema radicular, el ABA no parece implicado en la señalización por toxicidad iónica. La acumulación de ABA foliar en respuesta a estrés salino en condiciones de campo se relacionaría, por tanto, con señales procedentes de la raíz o incluso con deficiencias fisiológicas debidas al mal funcionamiento del sistema radicular.
- ❖ La acumulación de SA estaría relacionada con la presión del estrés oxidativo en tejidos fotosintéticos tanto en condiciones de estrés osmótico como de estrés salino.
- ❖ El genotipo MC no muestra ninguna ventaja a nivel bioquímico sobre el resto de patrones estudiados. Su mayor tolerancia se basa, en gran medida, en la capacidad para restringir la entrada de iones al sistema radicular y su transporte a la parte aérea.
- ❖ El CTV no provoca daños directos sobre el fotosistema, al menos a nivel de la antena.

- ❖ La disponibilidad de CO<sub>2</sub> en la cavidad subestomática no es un parámetro limitante en el proceso fotosintético en plantas infectadas por CTV. Las limitaciones en la actividad fotosintética inducidas por CTV se deben relacionar con una reducción de la eficiencia carboxilativa.
- ❖ La infección por CTV, independientemente de la virulencia de la cepa, provoca daño oxidativo en hojas del genotipo objeto de estudio debido en parte a la falta de activación de mecanismos de disipación de energía.
- ❖ Las plantas de lima mejicana infectadas muestran cierta capacidad de detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediante la activación del enzima APX. Sin embargo, este mecanismo de defensa se ve desbordado con el tiempo debido a la presión continua del estrés biótico.
- ❖ La acumulación de prolina es proporcional a la presión del estrés ejercida por la infección con CTV. Este compuesto se confirma como un marcador claro de daño en cítricos, descartándose una función efectiva como detoxificador de ROS.
- ❖ El descenso en la concentración de ABA foliar en plantas de lima infectadas podría, al menos en parte, explicar la elevada sensibilidad de este genotipo a la infección por CTV.
- ❖ El JA y el SA actúan como señales positivas de la infección de CTV en plantas de lima.
- ❖ El CTV ejerce un efecto fundamentalmente inhibitorio sobre el metabolismo secundario.
- ❖ El metabolismo secundario de la planta no sólo responde a la infección *per se* sino que la agresividad de la cepa vírica también es un elemento clave en la alteración de las rutas metabólicas.
- ❖ Existe una capacidad de respuesta específica del metabolismo secundario en función del estadio de desarrollo del brote infectado.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdala, G., Miersch, O., Kramell, R., Vigliocco, A., Agostini, E., Forchetti, G., Alemano, S.** (2003) Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. *Journal of Plant Growth Regulation* 40: 21-27.
- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E., Martin, G.B.** (2006) Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 103(8): 2851-2856.
- Agustí, M.** (2003) Citricultura. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Albacete, A., Martínez-Andujar, C., Ghanem, M.E., Acosta, M., Sanchez-Bravo, J., Asins, M.J., Cuartero, J., Lutts, S., Dodd, I.C., Perez-Alfocea, F.** (2009) Rootstock-mediated changes in xylem ionic and hormonal status are correlated with delayed leaf senescence, and increased leaf area and crop productivity in salinized tomato. *Plant, Cell and Environment* 32(7): 928-938.
- Ali Dib, T., Monneveux, P., Araus, J.L.** (1990) Breeding durum wheat for drought tolerance. Analytical, synthetical approaches, and their connections. In: Symposium on Wheat breeding. Prospects and future approaches. Varna, Bulgaria, pp. 1-33.
- Alonso-Ramirez, A., Rodriguez, D., Reyes, D., Jimenez, J.A., Nicolas, G., Lopez-Climent, M., Gomez-Cadenas, A., Nicolas, C.** (2009) Cross-talk between gibberellins and salicylic acid in early stress responses in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Signaling Behavior* 4(8): 750-1.
- Álvarez, M.E.** (2000) Salicylic acid in machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology* 44: 429-442.
- Álvarez, L.A., Vicent, A., De la Roca, E., Bascón, J., Abad-Campos, P., Armengol, J., García-Jiménez, J.** (2008) Branch cankers on citrus trees in Spain caused by *Phytophthora citrophthora*. *Plant Pathology* 57(1): 84-91.
- Amorós, M.** (2003) Los patrones en citricultura. Producción de agrios. Ed. Mundi-Prensa Libros SA. pp. 144-145.
- Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., Kazana, K.** (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3460-3479.
- Araus, J.L.** (2004) The problems of sustainable water use in the Mediterranean and research requirements agricultura. *Annals of Applied Biology* 144(3): 259-272.
- Araus, J.L., Amaro, T., Voltas, J., Nakkoul, H., Nachit, M.M.** (1998) Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Field Crop Research* 55: 209-223.

- Arbona, V., Gómez-Cadenas, A.** (2008) Hormonal modulation of Citrus responses to flooding. *Journal of Plant Growth Regulation* 27: 241-250.
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P., Gómez-Cadenas, A.** (2003) Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of *Carrizo citrange*, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant and Cell Physiology* 44: 388-394.
- Arbona, V., Marco, A.J., Domingo, J. Iglesias, D.J., López-Climent, M.F., Talón, M., Gómez-Cadenas, A.** (2005) Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 46: 153-160.
- Arbona, V., Hossain, Z., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A.** (2008) Antioxidant enzymatic activity is linked to water logging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum* 132: 452-66.
- Arbona, V., Iglesias, D.J., Talón, M., Gómez-Cadenas, A.** (2009b) Plant Phenotype Demarcation Using Nontargeted LC-MS and GC-MS Metabolite Profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(16): 7338-7347.
- Arbona, V., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A.** (2009a) Maintenance of a high photosynthetic performance in linked to flooding tolerance in citrus. *Environmental and Experimental Botany* 66: 135-142.
- Arregui, J.M., Ballester, J.F., Pina J.A., Navarro, L.** (1982) Influencia del sustrato y de la fertilización en el crecimiento de plantas de lima Mejicana (*Citrus aurantifolia* (Chritm.) Swing.) cultivadas en invernadero. *Anales Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) Serie Agrícola* 19: 61-82.
- Arumuganathan, K., Earle, E.D.** (1991) Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9(3): 211-215.
- Asada, K.** (1984) Assay of ascorbate-specific peroxidase. *Methods in Enzymology* 105: 427-429.
- Azcón-Bieto, J., Talón, M.** (2008) Fundamentos de Fisiología Vegetal. Capítulo 29: Fisiología de las plantas y el estrés (2<sup>nd</sup> ed.) Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, pp. 577-597.
- Baker, C.J., Orlandi, E.W.** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299-321.
- Balachandran, S., Osmond, C.B.** (1994) Susceptibility of tobacco leaves to photoinhibition following infection with two strains of tobacco mosaic virus under different light and nitrogen nutrition regimes. *Plant Physiology* 104: 1051-1057.
- Balachandran, S., Hull, R.J., Martins, R.A., Vaadia, Y., Lucas, W.J.** (1997a) Influence of environmental stress on biomass partitioning in transgenic tobacco plants expressing the movement protein of tobacco mosaic virus. *Plant Physiology* 114: 475-481.

- Balachandran, S., Hurry, V.M., Kelley, S.E., Osmond, C.B., Robinson, S.A., Rohozinski, J., Seaton, G.G.R., Sims, D.A.** (1997b) Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 100: 203-213.
- Balachandran, S., Osmond, C.B., Makino, A.** (1994) Effects of two strains of tobacco mosaic virus on photosynthetic characteristics and nitrogen partitioning in leaves of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi during photoacclimation under two nitrogen nutrition regimes. *Plant Physiology* 104: 1043-1050.
- Balachandran, S., Roberts, P.C., Kipperman, T., Bhalla, K.N., Compans, R.W., Archer, D.R., Barber, G.N.** (2000) Alpha/Beta Interferons Potentiate Virus-Induced Apoptosis through Activation of the FADD/Caspase-8 Death Signaling Pathway. *Journal of Virology* 74: 1513-1523.
- Banerjee, K., Guptan, R.C., Bisht, R., Sarin, S.K., Khandekar, P.** (1999) Identification of a novel surface mutant of hepatitis B virus in a seronegative chronic liver disease patient. *Virus Research* 65(2): 103-109.
- Banerjee, N., Wang, J.Y., Zaitlin, M.** (1995) A single nucleotide change in the coat protein gene of tobacco mosaic-virus is involved in the induction of severe chlorosis. *Virology* 207(1): 234-239.
- Bañuls, J., Primo-Millo, E.** (1992) Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of *Citrus* plants. *Physiologia Plantarum* 86: 115-123.
- Bañuls, J., Primo-Millo, E.** (1995) Effects of salinity on some *Citrus* scion-rootstock combinations. *Annals of Botany* 76: 97-102.
- Bañuls, J., Legaz, F., Talón, M., Primo-Millo, E.** (1990) Effect of salinity on uptake and distribution of chloride and sodium in some citrus scion-rootstock combinations. *Horticultural Science* 65: 715-724.
- Bañuls, J., Serna, M.D., Legaz, M., Primo-Millo, E.** (1997) Growth and gas exchange parameters of citrus plants stressed with different salts. *Plant Physiology* 150: 194-199.
- Bañuls, J., Serna, M.D., Legaz, F., Talón, M., Primo-Millo, E.** (1996) Factors underlying the response to salt stress in citrus trees. VIII Congress of the International Society of Citricultura, Sun City Resort, South Africa, p. 58.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.E., Clark, M.F., Loebenstein, G.** (1979) The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69: 190-194.
- Bar-Joseph, M., Roistacher, C.N., Garsey, M., Gumpf, D.J.** (1981) A review of tristeza, an ongoing threat to citriculture. *Proceedings of the 6th Conference of International Society Citriculture*. pp. 419-423.

- Bar-Joseph, M., Marcus, M.R., Lee, R.F.** (1989) The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27: 291-316.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D.** (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-208.
- Baulcombe, D.C.** (2000) Molecular biology. Unwinding RNA silencing. *Science* 290: 1108-1109.
- Beckman, J.S.** (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology* 9: 836-844.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R.** (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 272: 20313-20316.
- Bertness, M.D., Callaway, R.M.** (1994) Positive interactions in communities. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 191-193.
- Besoain, X., Ramella, F., Canales, C., Valenzuela, M., Castro, M., Gorris, M.T., Cambra, M.** (2003) Caracterización serológica de 100 aislados de *Citrus tristeza virus* (CTV), colectados desde las principales regiones citrícolas de Chile. 13er Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Marbella, pp. 28-31.
- Bilger, W., Björkman, O.** (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25: 173-185.
- Björkman, O., Demming-Adams, B.** (1987) Photon yield of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origin. *Planta* 170: 489-504.
- Blanke, M.M., Bower, J.P.** (1991) Small fruit problem in Citrus trees. *Trees-Structure and Function* 5(4): 239-243.
- Blum, A.** (1988) Plant Breeding for Stress Environments. CRC Press, Florida, p.223.
- Bou, F.** (1879) Estudio sobre el naranjo, limonero, cidro y otros árboles de la familia de las *Auranciáceas* que se cultivan en la provincia de Castellón. F. Segarra (eds.) Castellón, España.
- Boyer, S.J.** (2001) Growth-induced water potentials originate from wall yielding during growth. *Journal of Experimental Botany* 360(52): 1483-1488.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brakke, M., Allen, L.H.** (1995) Gas-exchange of citrus seedlings at different temperatures, vapor-pressure deficits, and soil-water contents. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120(3): 497-504.

- Breckle, S.W.** (2002) Salinity, halophytes and salt-affected natural ecosystems. In: Salinity: environment-plant-molecules. Läuchli, A., Lüttge, U. (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. NL, pp 53-77.
- Brennan, T., Frenkel, C.** (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology* 59: 411-416.
- Bretó, M.O., Ruiz C., Pina, J.A., Asins, M.J.** (2001) The diversification of *Citrus clementina* Hort. Ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21(2): 285-293.
- Briviba, K., Klotz, L.O., Sies, H.** (1997) Toxic and signalling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Journal of Biological Chemistry* 378: 1259-1265.
- Broadbent, P., Brlansky, R.H., Indsto, J.** (1996) Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease* 80: 329-333.
- Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A., Watson, L.** (1996) Viruses of Plant: Descriptions and Lists from the VIDE Database. CAB International, UK, pp. 1484.
- Buddenford-Joosten, J.M.C., Woltering, E.J.** (1994) Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation* 15:1-16.
- Cambra, M.** (1983) Diagnóstico del virus de la tristeza (CTV) mediante la técnica ELISA: interés y aplicaciones. *Levante Agrícola* 245: 11-17.
- Cambra, M.** (1994) El virus de la tristeza en la provincia de Castellón. Infección actual, previsiones y recomendaciones. *Levante Agrícola* 33(327): 105-111.
- Cambra, M., Moreno, P.** (2000) Tristeza. In: Moreno, P., Durán-Vila, N. (eds.) Enfermedades de los cítricos: Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. N°2. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa.
- Cambra, M., Moreno, P., Navarro, L.** (1979) Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-Sandwich. *Anales Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), Serie Protección Vegetal* 12: 115-125.
- Cambra, M., Garnsey, S.M., Permar, T.A., Henderson, C.T., Gumpf, D., Vela, C.** (1990b) Detection of citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology* 80: 1034.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquin, C., Román, M., Olmos, A., Martínez, M., Hermoso de Mendoza, A., López, A., Navarro, L.** (2000a) Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the Valencian Community of Spain. *Virus Research* 71: 85-95.

- Cambra, M., Gorris, M.T., Olmos, A., Martínez, M.C., Román, M.P., Bertolini, E., López, A., Carbonell, E.A.** (2002) European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for Citrus tristeza virus in adult trees. In: Duran-Vila, N., Milne, R.G., da Graça, J.V. (eds.) Proceedings of the 15th Conference of International Organization of Citrus Virologists, (IOCV), Riverside, pp. 69-77.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Román, M.P., Terrada, E., Garnsey, S.M., Camarasa, E., Olmos, A., Colomer, M.** (2000b) Routine detection of citrus tristeza virus by direct Immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. Proceedings 14th International Conference of the Organization of Citrus Virologists (IOCV), Riverside, pp. 34-41.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Serra, J., Camarasa, E., Pina, J.A., Sanz, A., Vela, C., Llatser, F.** (1991) Diagnóstico y estudio del virus de la tristeza de los cítricos utilizando técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos monoclonales específicos. *Levante Agrícola*: 176-186.
- Cambra, M., Serra, J., Bonet, J.C., Villalba, D.** (1990a) Situación de la tristeza de los cítricos en la Comunidad Valenciana, Generalidad Valenciana, Conselleria d'Agricultura i Pesca. Serie Fullets Divulgació nº 3-90, Valencia, p. 32.
- Cambra, M., Serra, J., Villalba, D., Moreno, P.** (1988) Present situation of the citrus tristeza virus in the Valencian Community. In: Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L. (eds.) Proceedings of the 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists, (IOCV), Riverside. pp. 1-7.
- Carrero, J.M.** (1981) Virosis y enfermedades afines de los cítricos. (2ª ed). Arabí, Musigraf., p. 411.
- Carrington, J.C.** (2000) RNA silencing. Moving targets. *Nature* 408: 150-151.
- Carver, T.L.W., Zeyen, R.J., Bushnell, W.R., Robbins, M.P.** (1994) Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D.C.) *Physiology and Molecular Plant Pathology* 44: 261-272.
- Castle, W.S., Tucker, D.P.H., Krezdorn, A.H., Youtsey, C.O.** (1993) Rootstocks for Florida citrus. Rootstock selection. The first step to success. *Institute of Food and Agricultural Sciences*. University of Florida, Florida. USA.
- Ceccarelli, S.** (1989) Wide adaptation: How wide? *Euphytica* 40: 197-205.
- Chapman, H.D.** (1968) The mineral nutrition of citrus. In: Reuther, W., Batchelor, L.D., Webber, H.D. (eds.) *The Citrus Industry*, Vol. II, University of California, Oakland USA, pp. 127-289.



- Charco, J.** (2002) Introducción al estudio de la velocidad de regeneración natural del bosque mediterráneo y de los factores antropozoógenos que la condicionan. Editor: La regeneración natural del Bosque Mediterráneo en la Península Ibérica, Servicio de publicaciones del Ministerio de Medio Ambiente.
- Chow, W.S., Lee, H.Y, Park, Y.N., Hong, Y.N., Anderson, J.M.** (2002) The role of inactive photosystem-II-mediated quenching in a last-ditch community defence against high light stress *in vivo*. *Philosophical Transactions of the Royal Society Lond B: Biological Sciences* 357: 1441-1450.
- Christmann, A., Moes, D., Himmelbach, A., Yang, Y., Tang, Y., Grill, E.** (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biology* 8: 314-325.
- Clarke, S.M., Mur, L.A.J., Wood, J.E., Scoot, I.M.** (2004) Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 38: 432-447.
- Claussen, W.** (2005) Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science* 168: 241-248.
- Cohen, S., Allasia, V., Venard, P., Notter, S., Vernière, C., Panabières, F.** (2003) Intraspecific variation in *Phytophthora citrophthora* from citrus trees in Eastern Corsica. *European Journal of Plant Pathology* 109: 791-805.
- Conejero, V., Semancik, J.K.** (1977) Exocortis viroid: alteration in the proteins of *Gynura aurantiaca* accompanying viroid infection. *Virology* 77: 221-232.
- Costa, A.S., Müller, G.W.** (1980) Tristeza control by cross protection: a US–Brazil cooperative success. *Plant Disease*. 64: 538-541.
- Creelman, R.A., Tierney, M.L., Mullet, J.E.** (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 89: 4938-4941.
- Czapski, G.** (1984) Reaction of ·OH. *Methods in Enzymology* 105: 209-215.
- Davies, F.S., Albrigo, L.G.** (1994) *Citrus*. C.A.B. International. Great Britain p. 244.
- Dawson, W.O., Hilf, M.E.** (1992) Host-range determinants plant viruses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 527-555.
- Debergh, P., Zimmerman, R.H.** (1991) *Micropropagation: Technology and Application* Kluwer Academic Publishers.
- Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F.** (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 547-575.
- Deng, Z., Gmitter, Jr.F.G.** (2003) Cloning and characterization of receptor kinase class disease resistance gene candidates in citrus. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 53-61.
- Devoto, A., Turner, J.G.** (2005) Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signaling network. *Physiologia Plantarum* 123: 161-172.

- Díaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P.M., Ros Barcelo A., Martínez-Gómez P., Hernández, J.A.** (2006) The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany* 57(14): 3813-3824.
- Dittrich, B., Robinson, W.P., Knoblauch, H., Buiting, K., Schmidt, K., Gillessen-Kaesbach, G., Horsthemke, B.** (1992) Molecular diagnosis of the Prader-Willi and Angelman syndromes by detection of parent-of-origin specific DNA methylation in 15q 11-13. *Hum Genet* 90: 313-315.
- Dodd, I.C., Egea, G., Davies, W.J.** (2008) Accounting for sap flow from different parts of the root system improves the prediction of xylem ABA concentration in plants grown with heterogeneous soil moisture. *Journal of Experimental Botany* 59: 4083-4093.
- Domínguez, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L.** (2000) Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of *citrus tristeza virus*. *Plant Cell Reports* 19: 427-433.
- Dong, X.** (1998) SA, JA, Ethylene. And disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 316-329.
- Dumet, D.** (1994) Cryoconservation des massifs d'embryons somatiques de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par deshydratation-vitrification. Etude du role du saccharose pendant le pretraitment. PhD thesis, L'Universite P. et M. Curie, Paris.
- Durán-Vila, N., Moreno, P.** (2000) Enfermedades de los Cítricos. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Durán-Vila, N., Pina, J.A., Juarez, J., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R., Semancik, J.S.** (1988) The citrus exocortis disease: A complex of viroid RNAs. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Organization of Citrus Virologists (IOCV), Riverside, pp. 152-164.
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J.V., Gómez-Cadenas, A.** (2005) Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8437-8442.
- Edreva, A.** (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 119-133.
- Else, M.A., Coupland, D., Dutton, L., Jackson, M.B.** (2001) Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus comunis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Physiologia Plantarum* 111: 46-54.

- Engel, N., Schmidt, M., Lütz, C., Feierabend, J.** (2006) Molecular identification, heterologous expression and properties of light-insensitive plant catalases. *Plant, Cell and Environment* 29: 593-607.
- Fagoaga, C., López, C., Hermoso de Mendoza, A., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L.** (2006) Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology* 60: 153-165.
- Fang, D.Q., Federici, C.T., Roose, M.L.** (1998) A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics* 150: 883-890.
- FAO** (2007) The State of Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en Internet: <http://www.fao.org/corp/statistics/en> Consultada el 3/11/2009.
- Farmer, E.E., Alméras, E., Krishnamurthy, V.** (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 372-378.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U.** (2005) Virus taxonomy: VIII<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W., Roose, M.L.** (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 812-822.
- Feierabend, J.** (2005) Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. In: Smirnoff N (ed.). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, pp. 101-40.
- Fergusson, L., Grattan, S.R.** (2005) How salinity damages *Citrus*: osmotic effects and specific ion toxicities. *Hortechology* 15: 95-99.
- Feys, B.J., Parker, J.E.** (2000) Interplay of signalling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics: TIG 2000* 16(10): 449-455.
- Flexas, J., Medrano, H.** (2002) Photosynthetic responses of C3 plants to drought. In 'Advances in Plant Physiology IV'. Hemantaranjan, A. (eds.), Scientific Publishers: Jodhpur.
- Flexas, J., Escalona, J.M., Medrano, H.** (1998) Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 893-900.
- Flint, D.H., Tuminello, J.F., Emptage, M.H.** (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *Journal of Biological Chemistry* 268: 22369-22376.

- Flors, V., Ton, J., van Doom, R., Jakab, G., García-Agustín, P., Mauch-Mani, B.** (2008) Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* 54: 81-92.
- Forner, J.B.** (1985) Características de los patrones de agrinos tolerantes a tristeza. Conselleria d'Agricultura i Pesca, Generalitat Valenciana.
- Forner-Giner, M.A.** (2002) Comportamiento de nuevos patrones de cítricos frente a la salinidad y el estrés hídrico. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Foyer, C.H., Noctor, G.** (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environmental* 28: 1056-1071.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunnert, K.J.** (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696-717.
- Fracchioli, G., Marani, F.** (1998) Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting: 346-380. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal, and H. Koganezawa. Plant virus disease control. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Fraser, B.P.** (1987) The diffusion of innovations: a comparison of a Sense-Making and traditional approach in a study of channel use and homophily. Doctoral dissertation, University of Washington. Advisor, Brenda Dervin.
- Fraser, L.** (1952) Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus. *Agricultural Gazette of New South Wales* 63: 125-131.
- Frost, H.B., Soots, R.K.** (1968) Seed reproduction development of gametes and embryos. In: Reuther, W., H.J. Webber, Batchelos L.D. (eds.). The citrus industry Vol II, Univ California, Berkeler, pp. 327-371.
- Fulton, R.W.** (1986) Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annual Review of Phytopathology* 24: 67-81.
- García-Sánchez, F., Syvertsen, J.P., Gimeno, V., Botia, P., Pérez-Pérez, J.G.** (2007) Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. *Physiologia Plantarum* 130(4): 532-542.
- Garner, B., Witting, P.K., Waldeck, A.R., Christison, J.K., Raftery, M., Stocker, R.** (1998) Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *Journal of Biological Chemistry* 273: 6080-6087.

- Garnier, M., Bové, J.M.** (1993) Citrus greening disease and the greening bacterium. In: Moreno P., da Graça J.V., Timmer L.W. (eds.) Proc. 12<sup>th</sup> *Conference of International Organization of Citrus Virologists*, (IOCV). Riverside, pp. 212-219.
- Garnsey, S.M., Lee, R.F.** (1988) Tristeza. 48-50. In: Compendium of citrus diseases. Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Timmer, L.W. (eds.) The American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul Minnesota, USA, p. 80.
- Garnsey, S.M., Müller, G.W.** (1986) Efficiency of mechanical transmission of *citrus tristeza virus*. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> Conference of International Organization of Citrus Virologists* (IOCV), Riverside, pp. 46-54.
- Genty, G., Briantais, J.M., Baker, N.R.** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochimica et Biophysica Acta* 99: 87-92.
- George, E.F., Hall, M.A., De Klerk., G.J.** (2008) Plant Propagation by Tissue Culture( 3<sup>rd</sup> Edition) Volume 1. the Background. Springer Verlag. Dordrecht, Netherlands.
- Ghorbel, R., Domínguez, A., Navarro, L., Peña, L.** (2000) High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic tree containing the coat protein gene of *citrus tristeza virus*. *Tree Physiology* 20: 1183-1189.
- Gilbertson, R.L., Lucas, W.J.** (1996) How do viruses traffic on the vascular highway? *Trends in Plant Science* 1: 260-268.
- Gilchrist, E., Haughn, G.** (2010) Reverse genetics techniques: engineering loss and gain of gene function in plants. *Briefings in Functional Genomics* 9(2): 103-110.
- Gillapsy, G., Ben-David, H., Gruissen, W.** (1993) Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* 5: 1439-1452.
- Gimeno, J., Gadea, J., Forment, J., Pérez-Valle, J., Santiago, J., Martínez-Godoy, M., Yenush, L., Bellés, J.M., Brumós, J., Colmenero-Flores, J.M., Talón, M., Serrano, R.** (2009) Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant Molecular Biology* 70(4): 403-420.
- Giner, B.** (1893) Tratado completo del naranjo. P. Aguilar (ed.) Valencia, España.
- Girish, K.R., Usha, R.** (2005) Molecular characterization of two soybean-infecting begomoviruses from India and evidence for recombination among legume infecting begomoviruses from South-East Asia. *Virus Research* 108: 167-176.
- Gómez, J.E., Narvaez, J.A., Narvaez, E.** (2009) Desarrollo e implementación de una red nacional para certificación fitosanitaria de cítricos competente a nivel mundial (PR 05100265). Corporación colombiana de investigación agropecuaria. CORPOICA. Centro de investigación de Palmira.

- Gómez-Cadenas, A., Arbona, V., Jacas, J., Talón, M., Primo-Millo, E.** (2002) Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 234-240.
- Gómez-Cadenas, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E., Talón, M.** (2000) Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta* 210: 636-643.
- Gómez-Cadenas, A., Pozo, O.J., García-Agustín, P., Sancho, J.V.** (2001a) Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray/ tandem mass spectrometry. *Phytochemical. Analysis* 13: 228-234.
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F., Moya, J.L., Primo-Millo, E., Talón, M.** (2001b) Alteraciones en la fisiología de los cítricos inducidas por salinidad. *Levante Agrícola* 356: 187-193.
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E., Talón, M.** (1998) Involvement of abscisic acid and ethylene in the response of citrus seedlings to salt shock. *Plant Physiology* 103: 475-484.
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Talón, M., Primo-Millo, E.** (1996) Leaf abscission induced by ethylene in water stressed intact seedlings of *Cleopatra mandarin* requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiology* 112: 401-408.
- Goodman, R.N., Kiraly, Z., Wood, K.E.** (1986). The biochemistry and physiology of plant disease. Columbia, MO; Univ. Missouri Press.
- Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., Cambra, M., Moreno, P., Irej, M., Bordón, J.** (1996) Differential effects of *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii* on temporal increase and spatial patterns of spread of citrus tristeza. In: da Graça, J.V., Moreno, P., Yokomi, R.K. (eds.). *Proceedings of the 13th Conference of International Organization of Citrus Virologists* (IOCV), Riverside, pp. 120-129.
- Gottwald, T.R., Gibson, G.J., Garnsey, S.M., Irej, M.** (1999) Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of citrus tristeza virus spread by Stochastic Modeling. *Phytopathology* 89: 603-606.
- Goyal, S.S., Sharma, S.K., Rains, D.W., Laüchli, A.** (1999) Long-term use of drainage waters of varying salinities for crop irrigation in a cotton-safflower rotation system in the San Joaquin Valley of California—a nine years study: I. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal Crop Production*. 2: 181-213.
- Grandbastien, M.A.** (1998) Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science* 3(5): 181-187.
- Halliwell, B.** (1987) Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids* 44: 327-340.

- Halliwell, B.** (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research* 31: 261-272.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., Aruoma, O.I.** (1995) The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 7: 601-617.
- Hamilton, E.W., Heckathorn, S.A.** (2001) Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology* 126(3): 1266-1274.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.** (1997) Plant Disease Resistance Genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 575-607.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Ataden, L.** (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21: 535-553.
- Havedla, Z., Maule, A.J.** (2000) Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible Cucurbita pepo cotyledons. *Plant Cell* 12(10): 1975-1985
- Hayata, Q., Hayata, S., Irfana, M., Ahmadb, A.** (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment. *Review of Environmental and Experimental Botany* 68(1): 14-25.
- Heath, M.C.** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
- Herbers, T.H.C., Russnogle, N.R., Elgar, S.** (2000) Spectral energy balance of breaking waves within the surf zone. *Journal of Physical Oceanography* 30: 2723-2737.
- Hernández, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P., Sevilla, F.** (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment* 23: 853-862.
- Hernández, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., del Rio, L.A.** (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Science* 105: 151-167.
- Herrero, R., Asíns, M.J., Carbonell, E.A., Navarro, L.** (1996) Genetic diversity in the orange subfamily *Aurarioideae* I. Intraespecies and intragenus genetic variability. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 599-609.
- Ho, T.H.D., Gómez-Cadenas, A., Zentella, R., Casaretto, J.** (2003) Crosstalk between gibberellin and abscisic acid in cereal aleurone. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 185-194.
- Hockema, B.R., Etxeberria, E.** (2001) Metabolic contributors to drought-enhanced accumulation of sugars and acids in oranges. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126(5): 599-605.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K.** (1999) Improving the thiobarbituric acid-reacting substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.

- Hodgson, R.W.** (1967) Horticultural varieties of *citrus*. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds.) *The Citrus Industry*. University of California Press, Berkeley. Vol I, pp. 431-591.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buintink, J.** (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plants Science* 6: 431-438.
- Horváth, E., Szalai, G., Janda, T.** (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal Plant Growth Regulation* 26: 290-300.
- Hossain, Z., López-Climent, M.F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A.** (2009) Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage *Journal of Plant Physiology* 166(13): 1391-1404.
- Hull, R.** (2002) *Matthew's Plant Virology*. 4<sup>th</sup> ed. Press
- Hutcheson, S.W.** (1998) Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 76: 3554-3557.
- Iglesias, D.J., Levy, Y., Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E., Talón, M.** (2004) Nitrate improves growth in salt-stressed citrus seedlings through effects on photosynthetic activity and chloride accumulation. *Tree Physiology* 24: 1027-1034.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabaka, S., Shinozaki, K., Kakimoto, T.** (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P.R., Arrese-Igor, C., Becana, M.** (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Journal of Plant Physiology* 116: 173-181.
- Jameson, P.E., Clarke, S.F.** (2002) Hormone-Virus Interactions in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(3): 205-228.
- Janick, J.** (2004) Genetic alterations associated with the origins of fruit culture. Proceedings of the XIth Eucarpia Symposium on Fruit. *Breeding and Genetics* 1-2(663): 683-691.
- Jia, W., Youqun, W., Shuqiu, Z., Jianhua, Z.** (2002) Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *Journal of Experimental Botany* 53: 2201-2206.
- Jiang, M.Y., Zhang, J.H.** (2004) Abscisic acid and antioxidant defense in plant cells. *Acta Botanica Sinica* 46: 1-9.
- Jordan, M., Casaretto, J.** (2007) Capítulo XV.- Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. In: *Fisiología Vegetal*. F. Squeo, L. Cardemil (eds.) Ediciones Universidad de la Serena, La Serena.
- Karasev, A.V.** (2000) Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology* 38: 293-324.



- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowsky, D.J., Dawson, W.O.** (1995) Complete sequence of the *citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology* 208: 511-520.
- Karpinski, S., Gabrys, H., Mateo, A., Karpinska, B., Mullineaux, P.M.** (2003) Light perception in plant disease defence signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 390-396.
- Kishor, P.B.K., Hong, Z.L., Miao, G.H., Hu, C.A.A., Verma, D.P.S.** (1995) Overexpression of Delta-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. *Plant Physiology* 108(4): 1387-1394.
- Krajewski, A.J., Rabe, E.** (1995) Citrus Flowering. A Critical-Evaluation. *Journal of Horticultural Science* 70(3): 357-374.
- Kramell, R., Atzorn, R., Schneider, G., Miersch, O., Brückner, C., Schmidt, J., Sembdner, G., Parthier, B.** (1995) Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *Journal of Plant Growth Regulation* 14: 29-36.
- Kuk, Y.I., Shin, J.S., Burgos, N.R., Hwang, T.E., Han, O., Cho, B.H., Jung, S., Guh, J.O.** (2003) Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science* 43: 2109-2117.
- Lamb, C., Dixon, R.A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275.
- Lambers, H., Stuart-Chapin III, F., Pons, T.L.** (1998) *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York.
- Larher, F., Lepoint, L., Petrivalsky M., Chappart, M.** (1993) Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 31: 911-922.
- Lawlor, D.W.** (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* 89: 871-885.
- Leal, F., García M., Avilán, L.** (1984) El limón criollo. Caracas. Fusagri, p.63.
- Lee, T.M., Lur, H.S., Lin, Y.H., Chu, C.** (1996) Physiological and biochemical changes related to methyl jasmonate-induced chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant, Cell and Environment* 19: 65-74.
- Lehto, K; Tikkanen, M; Hiriart, JB, Paakkarinen, V., Aro, E.M.** (2003) Depletion of the photosystem II core complex in mature tobacco leaves infected by the Flavum strain of tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(12): 1135-1144.
- Levchenko V., Konrad K.R., Dietrich P., Roelfsema M.R.G., Hedrich R.** (2005) Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca<sup>2+</sup> signals. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 102: 4203-4208.

- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E.** (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 233: 346-357.
- Levitt, J.** (1980) Responses of plant to environmental stresses. Vol 1. (2<sup>nd</sup> ed.) Academic Press, New York.
- Li, C., Wong, W.H.** (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biology* 2.
- Li, L., Ingersoll, A.P., Vasavada, A.R., Porco, C.C., Del Genio, A.D., Ewald, S.P.** (2004) Life cycles of spots on Jupiter from Cassini images. *Icarus* 172: 9-23.
- Lichtenthaler, H.K.** (1996) Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *Journal of Plant Physiology* 148: 4-14.
- Lin, X., Inglis, G.D., Yanke, L.J., Cheng, K.J.** (1999) Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23(2): 149-153.
- López-Climent, M.F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A.** (2008) Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Environmental and Experimental Botany* 62: 176-184.
- Lucas, W.J.** (2006) Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344: 169-184.
- Ma, J., Ptashne, M.** (1987) Deletion analysis in GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* 48: 847-853.
- Maafi, Z.T., Damadzadeh, M.** (2008) Incidence and control of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, in the north of Iran. *Nematology* 10: 113-122.
- Maas, E.V.** (1993) Salinity and citriculture. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 3: 1290-1301.
- MARM** (2009) Avances de Superficies y Producciones Agrícolas. Agosto 2009. Ministerio de Medio Ambiente y del Medio Rural y Marino. Secretaría Técnica General. Gobierno de España. Disponible en Internet: <http://www.mapa.es/es/estadistica/infoestad.html> Consultada el 3/11/2009.
- Mahajan, S., Dolja, V.V., Carrington, J.C.** (1996) Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology* 70: 4370-4379.
- Mahouachi, J., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., Talón, M.** (2005) Antagonistic Changes between Abscisic Acid and Gibberellins in Citrus Fruits Subjected to a Series of Different Water Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* 24:179-187.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I.** (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.

- Malik, P.S., Kumar, V., Bagewadi, B., Mukherjee, S.K.** (2005) Interaction between coat protein and replication initiation protein of *Mung vean yellow mosaic India virus* might lead to control of viral DNA replication. *Virology* 337: 273-283.
- Manjunath, K.L., Lee, R.F., Niblett, C.L.** (2000) Recent advances in the molecular biology of citrus tristeza closterovirus. In: da Graça, J.V., Lee, R.F., Yokomi, R.K. (eds.). *Proceedings of the 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, (IOCV), Riverside, pp. 1-11.
- Mano, J.** (2002) Early events in environmental stresses in plants-induction mechanisms of oxidative stress. En: *Oxidative stress in plants*. Ed: Inzé, D., Van Montagu, M. Taylor & Francis, London. UK, pp. 217-246.
- Mansfield, T.J., Atkinson, C.J.** (1990) Stomatal behaviour in water stressed plants. In: RG Alscher and JR Cumming (eds.). *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*: New York, Wiley-Liss, pp. 241-264.
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Bosnia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolia, V.V., Duffus, J.E., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Murant, A.F., Namba, S., Niblett, C.L., Vetten, H.J., Yoshikawa, N.** (2000) Family *Closteroviridae*. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds.) *Virus Taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic, San Diego, pp. 943-964.
- Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P.M., Karpinski, S.** (2006) Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany* 57(8): 1795-1807.
- Mateo, A., Mühlenbock, P., Résterucci, C., Chang, C.C.C., Miszalski, Z., Karpinski, B., Parker, J.E., Mullineaux, P.M., Karpinski, S.** (2004) *Lesion Simulating Disease 1* is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiology* 136(1): 2818-2830.
- Matthews, P.H.** (1991) *Morphology*. 2<sup>nd</sup> edition. Cambridge, England: Cambridge University.
- Mauch-Mani, B., Mauch, F.** (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interaction *Current Opinion in Plant Biology* 8(4): 409-414.
- Mauch-Mani, B., Slusarenko, A.J.** (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8: 203-212
- Maxwell, K., Johnson, G.N.** (2000) Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.

- McAinsh, M.R., Clayton, H., Mansfield, T.A., Hetherington, A.M.** (1996) Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Journal of Plant Physiology* 111(4): 1031-1042.
- McClellan, A.P.D.** (1960) Seedling-yellows in South African citrus trees. *South African Journal of Agriculture Science* 3: 259-279.
- McClellan, A.P.D.** (1963) The tristeza complex: Its variability in field-grown citrus in South Africa. *South African Journal of Agriculture Science* 6: 303-332.
- Medrano, H., Escalona, J.M., Bota, J., Gulías, J., Flexas, J.** (2002) Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany* 89: 895-905.
- Mestre, P.F., Assins, M.J., Carbonell, E.A., Navarro, L.** (1997) New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. to citrus tristeza virus. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 691-695.
- Michel, B.E., Kaufmann, M.R.** (1973) The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiology* 51: 914-916.
- Miersch, O.** (1991) Synthesis of  $(\pm)$ -(10-h-2,11-(h-2)2,12-(h-2)(3) jasmonic acid. *Z. Naturforsch* 46b: 1727-1729.
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Bernalhok, J.C., Kobayashi, A.K., Pileggi, M., Leite, R.P., Pereira, L.F.P., Vieira, L.G.E.** (2004) Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science* 167(6): 1375-1381.
- Moller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A.** (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.
- Moore, G.** (2001) Orange and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics* 17(9): 536-540.
- Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V., Aparicio-Trejo, P.** (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194: 346-352.
- Moreno, P., Ambrós, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., Peña, L.** (2008) Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Review. Plant disease that changed the world. *Molecular Plant Pathology* 9(2): 251-268.
- Moreno, P., Guerri, J., Rubio, L., Vives, C., Sambade, A., Martín, S., Moya, P., Ambrós, S.** (2007) Variabilidad del agente casual de la tristeza de los cítricos: avances y perspectivas. Fitopatología Brasileira. Brazilian Phytopathology. *Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatología* (Suplemento Agosto de 2007) 88: 104-106.
- Morín, Ch.** (1967) Cultivo de los cítricos. Lima. Editorial IICA, p.508.

- Morris, K., Mackerness, S.A.H., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M., Carr, J.P., Buchanan-Wollaston, V.** (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal* 23: 677-685.
- Mörschbacher, B., Noll, U., Gorrichon, L., Reisener, H.** (1990) Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to wheat stem rust. *Plant Physiology* 93: 465-470.
- Moya, J.L., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., Talón, M.** (2003) Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. *Journal of Experimental Botany* 54: 825-833.
- Moya, J.L., Primo-Millo, E., Talón, M.** (1999) Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant, Cell and Environment* 22: 1425-1433.
- Moya, J.L., Tadeo, F.R., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., Talón, M.** (2002) Transmissible salt tolerance traits identified through reciprocal grafts between sensitive Carrizo and tolerant Cleopatra citrus genotypes. *Plant Physiology* 159: 991-998.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L.** (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(1): 31-57.
- Munns, R.** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- Munns, R., Tester, R.** (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Murashige, T., Tucker, D.P.H.** (1969) Growth factors requirements of citrus tissue. 1<sup>st</sup> Int. *Citrus Symposium* 3: 1155-1161.
- Naranjo, M.** (1997a) Reseña bibliográfica sobre la enfermedad tristeza de los cítricos. I. Antecedentes históricos, distribución mundial, agente causal y propiedades, rango de hospederos, sintomatología y clasificación de especies y variedades por su susceptibilidad. *Levante Agrícola* 36(340): 227-240.
- Naranjo, M.** (1997b) Reseña bibliográfica sobre la enfermedad tristeza de los cítricos. II. Diversidad de razas del virus, caracterización, formas de transmisión, diagnóstico y estrategias de control. *Levante Agrícola* 36(341): 355-368.
- Naumann, J.C., Young, D.R., Anderson, J.E.** (2008) Leaf chlorophyll fluorescence, reflectance, and physiological response to freshwater and saltwater flooding in the evergreen shrub, *Myrica cerifera*. *Environmental and Experimental Botany* 63: 402-409.

- Navarro, L.** (1981) Versión de la conferencia ofrecida por el Dr. Luis Navarro Lucas sobre la enfermedad de la tristeza de los cítricos. La Habana. CIDA, p. 33.
- Navarro, L.** (1984) La virosis de los agrios y su control. *Historia de la naranja* 24: 466-471.
- Navarro, L., Pina, J.A., Juárez, J., Ballester-Olmos, J.F., Arregui, J.M., Ortega, C., Navarro, A., Duran-Vila, N., Guerri, J., Moreno, P., Cambra, M., Zaragoza, S.** (2003) Situación actual de los programas de saneamiento, cuarentena y certificación de cítricos en España. *Phytoma España*: 68-73.
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M.** (1996) Physiology of plants under stress. In: Abiotic factors. John Wiley & Sons (eds.) INC, New York.
- Norman, C., Howell, K.A., Millar, A.H., Whelan, J.M., Day, D.A.** (2004) Salicylic acid is and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiology* 134: 492-501.
- O'Donnell, P.J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J.B., Klee, H.J.** (2003) Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiology* 133(3): 1181-1189.
- Okuma, E., Murata, Y.** (2004) Plant ion channels as potential targets of agro-chemicals. *Journal Pesticide Science* 29(4): 304-307.
- Ollitrault, P., Faure, X.** (1992) Système de reproduction et organization de la diversité génétique dans le genre Citrus. In: B.R.G. (eds.) Complexe d'espèce, flux de gènes et ressources génétiques. Actes du Colloque International, Paris, pp. 133-151.
- Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas** (2004) Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes European and Mediterranean Plant Protection Organization. Diagnostic protocols for regulated pests. *Citrus tristeza closterovirus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34: 239-246.
- Ortuno, M.F., Alarcon, J.J., Nicolas, E., Torrecillas, A.** (2004) Interpreting trunk diameter changes in young lemon trees under deficit irrigation. *Plant Science* 167(2): 275-280.
- Osmond, C.B., Grace, S.C.** (1995) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal Experimental Botany* 46: 1351-1362.
- Osmond, C.B., Anderson, J.M., Ball, M.C., Egerton, J.J.G.** (1999) Compromising efficiency: the molecular ecology of light-resource utilization in plants. In: Physiological Plant Ecology. Press MC, Scholes JD (eds.) Blackwell Science.
- Palma, F., Lluch, C., Iribarne, C., García-Garrido, J.M., Tejera, N.A.** (2009) Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Growth Regulation* 58: 307-316.

- Papadakis, I.E., Protopapadakis, E.E., Therios, I.N.** (2009) Yield and fruit quality of 'Nova' hybrid [*Citrus clementina* hort. ex Tanaka x (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macfad)] and two Clementine varieties (*C. clementina* hort. ex Tanaka) as affected by self- and cross-pollination *Scientia Horticulturae* 121(1): 38-41.
- Parry, M.L., Rosenzweig, C., Livermore, M.** (2005) Climate change, global food supply and risk of hunger. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 2125-2136.
- Peña-Cortés, H., Barrios, P., Dorta, F., Polanco, V., Sánchez, C., Sánchez, E., Ramírez, I.** (2005) Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 246-260.
- Pérez, R.M.** (2000) Cryostorage of citrus embryogenic cultures. In: Jain S.M., Gupta, P.K., Newton, R.J. (eds.) *The Netherlands Kluwer Academic Publishers*, pp. 687-705.
- Pérez-Clemente, R.M., Montoliu, A., López, P., López-Climent, M.F., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A.** (2006) *In vitro* tissue culture approaches for the study of salt stress in citrus. In: International Conference on Biosaline Agriculture. Túnez, p. 167.
- Pérez-Clemente, R.M., Pérez-Sanjuán, A., García-Ferriz, L., Beltrán, J.P., Cañas, L.A.** (2004) Transgenic peach plants (*Prunus pérsica* L.) produced by genetic transformation of embryo-sections using the green fluorescent protein (GFP) as an *in vitro* marker. *Molecular Breeding* 14: 419-427.
- Perl-Treves, R., Perl, A.** (2002) Oxidative stress: an introduction. In: *Oxidative stress in plants*. Inzé, D., Van Montagu, M. Taylor, Francis (eds.) London. UK, pp. 1-32.
- Pfannschmidt, T., Allen, J.F., Oelmüller, R.** (2001) Principles of redox control in photosynthesis gene expression. *Physiologia Plantarum* 112: 1-9.
- Pfannschmidt, T., Schutze, K., Fey, V., Shrameti, I., Oelmüller, R.** (2003) Chloroplast redox control of nuclear gene expression a new class of plastid signals in interorganellar communication. *Antioxidants and Redox Signaling* 5: 95-101.
- Pitman, M.G., Läuchli, A.** (2002) Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: *Salinity: environment-plant-molecules*. Läuchli, A., Lüttge, U. (eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. NL, pp. 3-20.
- Planes, S., González-Sicilia, E., Martí, F.** (1965) Studies of citrus virus diseases. In: Price, W.C. (eds.) *Proceeding of 3<sup>rd</sup> International Conference Organization of Citrus Virology* (IOCV) University of Florida Press, Gainesville, pp. 226-227.
- Pons, J., Reverter, A.J., Pastor, J., Forner, J.B.** (1998) Adaptación del citrange troyer a los contenidos en carbonatos totales y caliza activa del suelo. *Levante agrícola* 37(344): 242-245.
- Pozo, L.V.** (2001) Endogenous hormonal status in citrus flowers and fruitlets: relationship with postbloom fruit drop. *Horticultural Science* 91: 251-260.

- Pozo, M.J., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J.** (2005) Jasmonates–signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 211-222.
- Radhakrishnan, G.K., Splitter, G.A., Ramakrishnan-Usha, R.** (2008) DNA recognition properties of the cell-to-cell movement protein (MP) of soybean isolate of *Mungbean yellow mosaic India virus* (MYMIV-Sb). *Virus Research* 131: 152-159.
- Radwan, D.E.M., Fayez, K.A., Mahmoud, S.Y., Hamad, A., Lu, G.** (2006) Salicylic acid alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by *zucchini yellow mosaic virus* infection in *Cucurbita pepo* leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69(4-6): 172-181.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., Barón, M.** (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function. *Physiologia Plantarum* 110: 286-292.
- Rajoy, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., Job, D.** (2006) Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology* 141: 910-923.
- Rao, A.L.N., Cooper, B.** (2006) Capsid protein gene and the type of host plant differentially modulate cell-to-cell movement of *cowpea chlorotic mottle virus*. *Virus Genes* 32: 219-227.
- Raskin, I.** (1995) Salicylic acid. In: *Plant Hormones–Physiology, biochemistry and molecular biology*. Davies, P.J. (eds.) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. NL, pp. 188-205.
- Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S., Greenberg, J.T.** (1999) The gain-of-function *Arabidopsis acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* 11: 1695-1708.
- Rico, L.** (2005) Nuevos retrotransposones de naranjo. Desarrollo de marcadores basados en retrotransposones para la evaluación de la biodiversidad de los cítricos. Universidad de Barcelona. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Tesis Doctoral.
- Rios, G., Naranjo, M.A., Iglesias, D.J., Ruiz-Rivero, O., Geraud, M., Usach, A., Talón, M.** (2008) Characterization of hemizygous deletions in Citrus using array-Comparative Genomic Hybridization and microsynteny comparisons with the poplar genome. *BMC genomics* 9: 381.
- Rocha-Peña, M.A., Lee, R., Lastra, R., Niblett, C., Ochoa-Corona, F., Garnsey, S., Yokomi, R.** (1995) Citrus tristeza virus its aphid vector *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* 79(5): 437-445.
- Roistacher, C.N.** (1991) Graft-transmissible diseases of citrus, handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome, pp. 286.



- Roistacher, C.N., Moreno, P.** (1991) The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus. In: Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. (eds.) *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*, Riverside, pp. 7-19.
- Rojo, E., Solano, R., Sánchez-Serrano, J.J.** (2003) Interactions between signalling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 82-98.
- Román, M.P., Cambra, M., Juárez, P., Moreno, P., Duran Vila, N., Tanaka, E., Kitajama, E.W., Yamamoto, P.T., Bassanezi, R.B., Teixeira, D.C., Jesús Junior, W.C., Ayres, A.J., Gimenez-Fernandez, N., Rabenstein, F., Girotto, L.F., Bové, J.M.** (2004) Sudden death of citrus in Brazil: a graft transmissible bud union disease. *Plant Disease* 88: 453-467.
- Romero-Aranda, R.M., Moya, J.L., Tadeo, F.R., Legaz, F., Primo-Millo, E., Talón, M.** (1998) Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of the cations. *Plant, Cell and Environment* 21: 1243-1253.
- Roose, M.L., Williams, T.E.** (2007) Mutation breeding. I. Ahmad Khan, pp. 335-352.
- Ruíz, C., Asins, M.J.** (2003) Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. *Theoretical and Applied Genetics* 106(5): 826-36.
- Ruíz, D., Martínez, V., Cerdá, A.** (1997) Citrus response to salinity: growth and nutrient uptake. *Tree Physiology* 17: 141-150.
- Ruíz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W.J.** (2001) The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 202-209.
- Ruíz-Ruíz, S., Moreno, P., Guerri, J.** (2006) The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of Citrus tristeza virus from Spain: comparison with isolates from different origins. *Archives of Virology* 151: 387-398.
- Rullán, J.** (1896) Cultivo del naranjo en las Baleares. Imp. La Sinceridad, Soller, España.
- Salvador, M.L., Carbonell, J., García-Martínez, J.L.** (1983) Alteraciones hormonales en floema de corteza de naranjos afectados por tristeza. *Revista de agronomía y tecnología de alimentos* 23(2): 217-226.
- Salvador, M.L., Carbonell, J., García-Martínez, J.L.** (1984) Alteraciones hormonales en lima mejicana afectada por tristeza. *Revista de agronomía y tecnología de alimentos* 24(1): 59-66.
- Sampol, B., Bota, J., Riera, D., Medrano, H., Flexas, J.** (2003) Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist* 160: 403-412.
- Sano, H., Seo, S., Koizumi, N., Niki, T., Iwamura, H., Ohashi, Y.** (1996) Regulation of cytokinins and endogenous levels of jasmonic and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants. *Plant Cell Physiology* 37: 762-769.

- Sauter, K., Dietz, J., Hartung, W.** (2002) A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant, Cell and Environment* 25: 223-228.
- Savage, E.M., Gardner, F.E.** (1965) The Troyer and Carrizo citranges. *California Citricraph* 50: 112-116.
- Save, R., Pery, M., Marfa, O., Serrano, L.** (1995) The effect of a hydrophilic polymer on plant water status and survival of transplanted pine seedlings *Hort Technology* 5(2): 141-143.
- Schaller, F., Schaller, A., Stintzi, A.** (2005) Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 179-199.
- Schneider, H.** (1959) The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: Citrus Virus Diseases. Wallace, J.M. (eds.) Berkeley, C.A. University of California Division of Agricultural Sciences, pp. 73-84.
- Semancik, J. S., Conejero, V., Gerhart, J.** (1977) Citrus exocortis viroid: Survey of protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes following addition of viroid RNA. *Virology* 80: 218-221.
- Sembdner, G., Parthier, B.** (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 569-589.
- Sgherri, C., Maffei, L.C., Navari-Izzo, F.** (2000) Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. *Journal Plant Physiology* 157: 273-279.
- Shah, J.** (2009) Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 459-464.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M.** (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Plant Physiology* 112: 487-494.
- Shennan, C., Grattan, S.R., May, D.M., Hollhouse, C.J., Schachtman, D.P., Wander, M., Roberts, B., Tafoya, S., Buran R.G., McNeish, C., Zelinski, L.** (1995) Feasibility of cyclic reuse of saline drainage in a tomato-cotton rotation. *Journal of Environmental Quality* 24: 476-486.
- Shirasu, K., Schulze-Lefert, P.** (2003) Complex formation, promiscuity, and multifunctionality: protein interactions in disease resistance pathways. *Trends in Plant Science* 8: 252-258.
- Sholes, J.D., Lee, P.J., Horton, P., Lewis, D.H.** (1994) Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist* 126: 213-222.
- Sies, H.** (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie* 25: 1058-1071.

- Sies, H.** (1991) Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69: 965-968.
- Sies, H.** (1993a) Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research* 299: 183-191.
- Sies, H.** (1993b) Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 215(2): 213-219.
- Sigalov, A.B., Stern, L.J.** (1998) Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I. *FEBS Letters* 433: 196-200.
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Métraux, J.P., Raskin, I.** (1995) Salicylic acid in rice. Biosynthesis, conjugation, and possible rol. *Plant Physiology* 108: 633-639.
- Singh, A., Saini, M.L., Behl, R.K.** (2004) *In vitro* screening of citrus rootstocks for salt tolerance. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 64: 54-57.
- Singh, B.K., Sharma, S.R., Singh, B.** (2010) Antioxidant enzymes in cabbage: Variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. *Scientia Horticulturae* 124: 9-13.
- Slater, T.F.** (1984) Free radical mechanism in tissue injury. *Biochemical Journal* 222: 1-15.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M., Stoutjesdijk, P.A., Waterhouse, P.M.** (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319-320.
- Soost, R.K., Cameron, J.W.** (1975) *Citrus*. In: Janick J, Moore JN (eds.). *Advances in Fruit Breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, pp. 507-540.
- Soto, M.J., Chen, L.F., Seo, Y.S., Gilbertson, R.L.** (2005) Identification of regions of the Beet mild curly top virus (family *Geminiviridae*) capsid protein involved in systemic infection, virion formation and leafhopper transmission. *Virology* 341: 257-270.
- Srivastava, L.M.** (2002) *Plant growth and development. Hormones and environment*. Academic Press, London. UK.
- Stacey, G., McAlvin, C.B., Kim, S.Y., Olivares, J., Soto, M.J.** (2006) Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicas* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 141: 1473-1481.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L.** (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207-218.
- Storey, R., Walker, R.R.** (1999) Citrus and salinity. *Horticultural Science* 78: 39-81
- Swingle, W.T.** (1967) The Botany of Citrus and its wild relatives. In: The Citrus Industry, vol I, W. Reuther, L.D. Batchelor and H.J. Webber (eds.) *Institute of Food and Agricultural Sciences*. University of Florida, California, USA.
- Taiz, L., Zeiger, E.** (2006) *Plant physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California, USA, p.559.

- Takei, K., Sakakibara, H., Sugiyama, T.** (2001) Identification of genes encoding adenylate isopenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 26405-26410.
- Talón, M., Tad, F.R., Zeevaert, J.A.D.** (1991) Cellular changes induced by exogenous and endogenous gibberellins in the shoot tips of the long-day plant *Silene armeria*. *Planta* 185: 487-493.
- Tambussi, E.A.** (2004) Fotosíntesis, Fotoprotección, Productividad y Estrés Abiótico: algunos casos de estudio. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Tanji, K.K.** (2002) Salinity in the soil environment. In: Salinity: environment-plants-molecules. Ed: Läuchli, A, Lüttge, U. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. NL, pp. 21-52.
- Timmer, L.W.** (1988) Phytophthora-induced diseases. In: Whiteside JO, Garnsey SM, Timmer LW (eds.) Compendium of Citrus diseases. APS Press, Am Phytopathol Soc St Paul, Min, pp. 22-25.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J.H.** (2000) Compendium of Citrus Disease. St Paul, MN: APS Press.
- Ton, J., Mauch-Mani, B.** (2004)  $\beta$ -Amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal* 38: 119-130.
- Ton, J., Jakab, G., Toquin, V., Flors, V., Lavicoli, A., Maeder, M.N., Métraux, J.P., Mauch-Mani, B.** (2005) Dissecting the  $\beta$ -Aminobutyric Acid-Induced Priming Phenomenon in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 987-999.
- Toumi, I., Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Bouamama, B., Ben Salem-Fnayou, A., Ghorbel, A.W., Mliki, A., Roubelakis-Angelakis, K.A.** (2010) Abscisic acid signals reorientation of polyamine metabolism to orchestrate stress responses via the polyamine exodus pathway in grapevine. *Journal of Plant Physiology* 167: 519-525.
- Troncoso, A., Matte, C., Cantos, M., Lavee, S.** (1999) Evaluation of salt tolerance of in vitro grown grapevine rootstock varieties. *Vitis* 38(2): 55-60.
- Tsonev, T.D., Lazova, G.N., Stoinova, Z.G., Popova, L.P.** (1998) A possible role for jasmonic acid in adaptation of barley seedlings to salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 17: 153-159.
- Tudela, D., Primo-Millo, E.** (1992) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiology* 100: 131-137.
- Türkan, I., Bor, M., Ozdemir, F., Koca, H.** (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168(1): 223-231.

- Turner, N.C.** (1986) Adaptation to Water Stress Deficit. A Changing Perspective. *Journal Plant Physiology* 13: 175-190.
- Turner, J.G., Ellis, C., Devoto, A.** (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14: 153-164.
- Van Vuuren, P., Collins, R.P., Da Graça, J.V.** (1993) Evaluation of citrus tristeza isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease* 77: 24-28.
- Vance, C.P., Kirk, T.K., Sherwood, R.T.** (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 18: 259-288.
- Vives, M.C., Rubio, L., López, C., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Dawson, W.O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P.** (1999) The complete genome of the mayor component of mild *Citrus tristeza virus* isolate. *Journal of General Virology* 80: 811-816.
- Vlot, A.C., Dempsey, M.A., Klessig, D.F.** (2009) Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- Vuleta, A., Jovanovic, S.M., Darka Seslija, D., Tucic, B.** (2010) Seasonal dynamics of foliar antioxidative enzymes and total anthocyanins in natural populations of *Iris pumila* L. *Journal of Plant Ecology* 1(3): 59-69.
- Walker, R.R., Sedgley, M., Blesing, M.A., Douglas, T.J.** (1984) Anatomy, ultrastructure and assimilate concentrations of roots of citrus genotypes differing in ability for salt exclusion. *Journal of Experimental Botany* 35: 1481-1494.
- Wallace, J.M., Drake, R.J.** (1951) Recent developments in studies quick decline and related diseases. *Phytopathology* 41: 785-793.
- Wallace, J.M., Drake, R.J.** (1972) Studies on recovery of citrus plants from seedling yellows and the resulting protection against reinfection. In: Price, W.C. (eds.) *Proceedings of the 5th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. University of Florida Press, Gainesville, pp. 127-136.
- Wang, S.Y.** (1999) Methyl Jasmonate reduces water stress in strawberry. *Journal of Plant Growth Regulation* 18: 127-134.
- Wasternack, C.** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 100: 681-697.
- Weston, L.A.** (1996) Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy Journal* 88: 860-866.
- Whenham, R.J., Fraser, R.S.S., Brown, L.P., Payne, J.A.** (1986) Tobacco mosaic virus-induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location in light and dark-green areas, and relationship to symptom development. *Planta* 168: 592-598.

- Wilkinson, S., Davies, W.J.** (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 195-210.
- Wong, S.H., Knight, J.A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Leach, Ch.N.Jr., Sunderman, W.Jr.** (1987) Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry* 32(2): 214-220.
- Xiang, C., Oliver, D.J.** (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metal and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1539-1550.
- Yaegashi, H., Takahashi, T., Isogai, M., Kobori, T., Ohki, S., Yoshikawa, N.** (2007) Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology* 88: 316-324.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses: *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803.
- Yang, H.J., Li, Y.Q., Hua, J.** (2006) The C2 domain protein BAP1 negatively regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 48(2): 238-248.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Asami, T., Maruya-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S., Nakashita, H.** (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1678-1692.
- Yoshida, T.** (1996) Graft compatibility of *Citrus* with plants in the *Aurantioideae* and their susceptibility to citrus tristeza virus. *Plant Disease* 80: 414-417.
- Young, A.J.** (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum* 83: 702-708.
- Zaitlin, M., Hull, R.** (1987) Plantvirus-host interactions. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 291-315.
- Zaragoza, S.** (1993) Pasado y presente de la citricultura española. Generalitat Valenciana, Sèrie Divulgació Tècnica, n°8, Valencia, España.
- Zeevaart, J.A.P., Gage, D.A., Talón, M.** (1993) Gibberellin A1 is required for stem elongation in spinach under long-day conditions. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 90: 7401-7405.
- Zhang, Y.J., Qian, Y.Q., Mu, X., Cai, Q.G., Zhou, Y.L., Wei, X.P.** (1998) Plant regeneration from *in vitro*-cultured seedling leaf protoplasts of *Actinidia eriantha* Benth. *Plant Cell Reports* 17: 819-821.
- Zhou, B.Y., Guo Z.F., Liu Z.L.** (2005) Effects of abscisic acid on antioxidant systems of *Stylosanthes guianensis* (Anblet) Sw. under chilling stress. *Crop Science* 45: 599-605.

## **8. ANEJO**





# In Vitro Adventitious Rooting of Carrizo Citrange Microshoots

Almudena Montoliu, Aurelio Gómez-Cadenas, and Rosa M. Pérez-Clemente<sup>1</sup>

Laboratorio de Ecofisiología y Biotecnología, Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Universitat Jaume I, E-12071 Castellón de la Plana, Spain

*Additional index words.* citrus, micropropagation, auxin, activated charcoal

**Abstract.** The objective of this work was to develop an efficient in vitro rooting protocol for one of the most commercially used citrus rootstocks in Spain, Carrizo citrange (*Citrus sinensis* L. Osbeck × *Poncirus trifoliata* L. Raf.). Single-node cuttings taken from greenhouse-grown plants were cultured in petri dishes containing basal Murashige and Skoog medium. Shoots from nodal stem segments were excised and cultured in a multiplication medium (basal medium supplemented with 1.8 μM 6-benzylaminopurine) to promote the development of axillary buds. Individual shoots (15 mm long) were treated with different hormones at several concentrations for root induction evaluations. The addition of activated charcoal (AC) to the culture medium was also explored. The addition of auxins to the culture medium enhanced rooting percentage. Optimal results were obtained when 1-naphthalene acetic acid (10.8 μM) and gibberellic acid (0.3 μM) were added to the culture medium. The addition of AC to the rooting medium resulted in negative effects on the percentage of rooted shoots but had a positive effect on number of roots per rooted shoot. Chemical names used: activated charcoal (AC); 6-benzylaminopurine (BA); 1-naphthalene acetic acid (NAA); gibberellic acid (GA<sub>3</sub>); indole-3-butyric acid (IBA)

The efficient de novo regeneration of plants from cell and tissue cultures is recognized as a prerequisite for the application of biotechnological approaches to crop improvement (Castellanos et al., 2008; Nehra et al., 2005).

During the last 30 years, it has become possible to regenerate plantlets from explants and callus in many types of plants. As a result, large-scale micropropagation protocols are available for a wide range of species and, at present, tissue-culture technology is widely used for the vegetative propagation of selected plants in horticulture and, to a lesser extent, in forestry (Debergh and Zimmerman, 1991; George et al., 2008).

Highly efficient and reproducible methods for in vitro regeneration through somatic embryogenesis or organogenesis are a prerequisite for clonal propagation of selected genotypes (Debergh and Zimmerman, 1991; George et al., 2008). Although plant regeneration through somatic embryogenesis systems has been reported in a number of species, the production of plants from axillary buds or shoots has proven to be the most generally applicable and reliable method of true-to-type in vitro propagation (George et al., 2008).

Micropropagation is used for the commercial-scale propagation of several woody species such as *Vitis*, *Prunus* rootstocks, *Malus*, and so on (George et al., 2008). However, in many others species, adventitious root formation is still a major problem. Root formation of woody species was found to be regulated by a great number of factors, including to a great extent auxins (Arená et al., 2005; Baksha et al., 2003; George et al., 2008). Some progress has been made in rooting of different species using different chemical or natural compounds in the rooting media (Fotso et al., 2004).

Research has indicated the activated charcoal (AC) alone or in combination with auxins can promote growth and development because of its capacity to adsorb inhibitory substances, decrease phenolic oxidation, buffer pH, or establish a dark environment simulating soil conditions (reviewed in Thomas, 2008).

There have been some reports on organogenesis from different types of explants in citrus genotypes as reviewed by Carimi (2001). The morphogenic responses of citrus cultured in vitro are influenced by the genotype, the explant type, and the culture medium. Several attempts to induce in vitro rhizogenesis have been described for different explants (nodal and internodal segments, hypocotyls, epicotyls, shoot tip, and internodal seedling stem sections) from several citrus species (*Citrus sinensis*, *Poncirus trifoliata*, *C. acida*, *C. aurantifolia*, and *C. limon*) through the addition of plant growth regulators in various combinations and concentrations (Al-Bahrany, 2002; Bordón et al., 2000; Chakravarty and Goswami, 1999; Hassanein and Azooz, 2003).

Because of the variable response of citrus species and cultivars to the in vitro environment, the objective of this study was to improve rooting efficiency of Carrizo citrange microshoots produced from cultures initiated from nodal explants. Carrizo citrange is a main citrus rootstock widely used in important citrus-producing areas such as Spain and California, where ≈90% of the new plantings are grafted onto citranges.

## Materials and Methods

**Plant material and culture media.** Three-year-old greenhouse-grown plants of the citrus rootstock Carrizo citrange [*Citrus sinensis* L. Osbeck × *Poncirus trifoliata* L. Raf. (CC)] were used as source of plant material. Stem pieces (15 cm long) were stripped of leaves, disinfected by immersion for 10 min in a 2% (v/v) sodium hypochlorite solution containing 0.1% (v/v) Tween 20, followed by three rinses, 5 min each, in sterile water. Node stem segments (1 cm long) were cultured in petri dishes (10 cm diameter) with 25 mL of basal medium containing the inorganic salts of Murashige and Skoog (1962) supplemented with 0.55 mM i-inositol, 4.8 μM pyridoxine-HCl, 0.6 μM thiamine-HCl, 8 μM nicotinic acid, and 88.2 mM sucrose. The medium was solidified with 9 g·L<sup>-1</sup> agar (Pronadisa, Madrid, Spain). The pH was adjusted to 5.7 ± 0.1 with 0.1 N NaOH before autoclaving.

Shoots recovered from nodal stem segments were excised from the explant and cultured in 150 × 20-mm tubes on a multiplication medium to promote the development of axillary buds. The multiplication medium consisted of basal medium supplemented with 1.8 μM 6-benzylaminopurine (BA). New shoots from axillary buds were excised when they reached 15 mm for use in subsequent experiments.

Throughout the experimental period, all cultures were maintained at 26 ± 2 °C with a 16-h photoperiod provided by cool-white fluorescent light (70 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). Subcultures were performed every 2 weeks.

**Effect of different plant growth regulators on in vitro rooting.** Individual shoots (15 mm long) cultured into 150 × 20-mm tubes were subjected to different rooting treatments following procedures reported in the literature (Table 1). Rooting media consisted of basal medium supplemented with the following: 5.4 μM 1-naphthalene acetic acid (NAA) plus 0.3 μM gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (R1); 8.1 μM NAA plus 9.8 μM 3-indolebutyric acid (IBA) (R2); 1.1 μM BA, 2.7 μM NAA plus 4.9 μM IBA (R3); 5.4 μM NAA (R4); and 2.7 μM NAA plus 9.8 μM IBA (R5) (Al-Bahrany, 2002; Bordón et al., 2000; Chakravarty and Goswami, 1999; Hassanein and Azooz, 2003). In all cases, the medium was solidified by the addition of 9 g·L<sup>-1</sup> agar (Pronadisa). The pH was set at 5.7 ± 0.1 with 0.1 N NaOH before autoclaving.

According to preliminary rooting results, the following treatments were used for subsequent experiments: (R1.1) R1 plus 2.7 μM

Received for publication 24 Mar. 2010. Accepted for publication 28 Apr. 2010.

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación and the Generalitat Valenciana through grants No. AGL2007-65437-C04-03/AGR and ACOMP/2009/091, respectively.

<sup>1</sup>To whom reprint requests should be addressed; e-mail:rosa.perez@uji.es.

Table 1. Characteristics of the assayed rooting treatments.

Medium	BA ( $\mu\text{M}$ )	NAA ( $\mu\text{M}$ )	IBA ( $\mu\text{M}$ )	GA ( $\mu\text{M}$ )	PGR filter- sterilized	Dipping in IBA (50 $\mu\text{M}$ )	AC (12.0 $\mu\text{M}$ )	Reference
R1	0	5.4	0	0.3	No	No	No	Al-Bahrany, 2002; Bordón et al., 2000
R2	0	8.1	9.8	0	No	No	No	Al-Bahrany, 2002
R3	1.1	2.7	4.9	0	No	No	No	Hassanein and Azooz, 2003
R4	0	5.4	0	0	No	No	No	Chakravarty and Goswami, 1999
R5	0	2.7	9.8	0	No	No	No	Al-Bahrany, 2002
R1.1	0	8.1	0	0.3	No	No	No	NR
R1.2	0	10.8	0	0.3	No	No	No	NR
R5.1	0	2.7	9.8	0	Yes	No	No	NR
R5.2	0	2.7	9.8	0	No	Yes	No	NR
R5.3	0	2.7	9.8	0	No	No	Yes	NR
R5.4	0	2.7	9.8	0	No	Yes	Yes	NR

BA = 6-benzylaminopurine; NAA = 1-naphthalene acetic acid; IBA = indole-3-butyric acid; PGR = plant growth regulator; AC = activated charcoal; NR = the rooting treatment has not been reported in the literature.

NAA; (R1.2) R1 plus 5.4  $\mu\text{M}$  NAA; (R5.1) R5 composition, but in this case, the plant growth regulators were filter-sterilized (instead of autoclaved) and added to the medium once cooled down to 60 °C after autoclaving; (R5.2) R5 plus dipping of basal part of explant in an IBA concentrate solution (50  $\mu\text{M}$ ) for 10 s before subculture onto R5 medium; (R5.3) R5 plus 0.25  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  AC; and (R5.4) R5.3 plus a basal dip of the explant in an IBA concentrate solution (50  $\mu\text{M}$ ) for 10 s before subculture.

Measurements after 10, 20, 30, and 40 d of culture in rooting media included percentage of rooted shoots and number of roots per explant.

**Statistical analysis.** For each set of experiments, 48 replicates were used per treatment, and the experiment was repeated twice. One-way analysis of variance and comparisons between means were made following the least significant difference test at  $P \leq 0.05$  by using the STATGRAPHICS PLUS Version 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Herndon, VA) software (Montoliu et al., 2009).

## Results and Discussion

**Regeneration of shoots from in vitro cultured node explants.** As was described for other species (Dewan et al., 1992; Pereira et al., 1995), shoot multiplication appeared to be highly affected by the concentration of BA. Although the micropropagation of CC was not the main objective of this work, it was observed that the omission of BA in the medium resulted in single shoots only, but addition of 1.8  $\mu\text{M}$  BA stimulated shoot multiplication (data not shown).

**Effect of different treatments on in vitro rooting.** To improve in vitro rooting of CC shoots, different rooting media were used. The addition of BA together with NAA and IBA in the medium (R3) resulted in zero roots on CC shoots, even after 40 d of culture, in contrast to results obtained with *Citrus reticulata*, in which 85% of shoots rooted after 12 d culture (Hassanein and Azooz, 2003). Low rates of rooting were also observed in shoots cultured on medium containing exclusively NAA (R4) after 40 d on rooting medium.

The rooting process of different citrus genotypes in a culture media supplemented with 5.4  $\mu\text{M}$  NAA and 0.3  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> (R1) has been described. The percentage of rooted shoots was higher in R1 than the one observed in media containing other auxins in *Citrus aurantifolia* (Al-Bahrany, 2002) and was 28% for Troyer Citrange (Bordón et al., 2000). In our study, as shown in Table 2, the highest rooting rates in CC shoots were observed in medium supplemented with 5.4  $\mu\text{M}$  NAA and 0.3  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> was added to the medium (R1) or when the medium contained NAA (2.7  $\mu\text{M}$ ) in addition to 9.8  $\mu\text{M}$  IBA (R5). The pattern of rooting was different between shoots cultured in R1 or R5 medium throughout the experiment. In R1, the percentage of shoots that exhibited roots after 20 d of culture was 41.67% and this value remained almost constant throughout the rest of the experiment (45.45% at Day 40). In R5, only 23.21% of shoots had roots after 25 d in culture, which was significantly lower than the percentage observed in shoots cultured in R1 (42.00%). Rooting of shoots cultured in medium R5 progressively increased throughout the experimental period. At Day 30, the percentage of rooting in R5 was similar to that observed in R1 (39.87% in R5 versus 43.90% in R1) and at the end of the experiment (Day 40), shoots cultured in R5 exhibited the highest rooting rates (Table 2).

Number of roots per rooted shoot after different time periods is also shown in Table 2. In all cases, the number of roots per rooted shoot was similar after 25 d in culture regardless of the composition of the medium (with the exception of R3), ranging from 1.37 in R2 to 2.06 in R1 and R5. At Day 35, differences among treatments were evident with shoots in R5 showing the highest number of roots per shoot (5.08). At the end of the experiment (Day 40), the best results were obtained when R5 was used as culture medium (5.23) followed by R1 (4.14).

The presence of a higher number of adventitious roots on the shoots is highly recommended to ensure the success in the transfer of vitroplants to greenhouse conditions (George et al., 2008). It has been reported that in the genotypes *Citrus aurantifolia* (Al Bahrany, 2002) and *Citrus limon* (Pérez-Tornero et al., 2010), the number of roots formed per shoot increased in response to increasing IBA concentrations in combination with other auxin (NAA and indole-3-acetic acid, respectively) in the rooting medium. However, in CC, the best results were obtained when using 9.8  $\mu\text{M}$  IBA plus 2.7  $\mu\text{M}$  NAA in the rooting medium (R5) or 5.4  $\mu\text{M}$  NAA in absence of IBA (R1) (Table 2).

In most plants, the addition of gibberellins in the culture media is detrimental for in vitro rooting (George et al., 2008); in others such as *Citrus lemon*, gibberellins had no effect (Pérez-Tornero et al., 2010). Our results pointed that, in the case of CC, the addition of GA<sub>3</sub> had a positive effect. Therefore, the percentage of rooting after 40 d of treatment increased from 30.20% (R4) to 45.45% in R1 (R4 plus 0.3  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>). Moreover, GA<sub>3</sub> had a positive effect on the number of roots per rooted shoot, with the differences statistically significant between R1 and R4 (4.14 and 2.13 roots/rooted shoot, respectively).

To improve in vitro rooting of CC shoots, the two media that provided better results (R1 and R5) were modified and new experiments performed. The percentages of rooted shoots in each medium throughout the experimental period are shown in Table 3. Shoots cultured in media derived from R1, in which NAA concentration was increased, resulted in higher rooting percentage than its precursor; R1.2 (R1 plus 5.4  $\mu\text{M}$  NAA) provided the highest rate of rooting (68.18%). The percentage of rooted shoots in media derived from R5 was, in all cases, lower than that observed in R5. Neither of the following variations had a positive effect on rooting: filter sterilization of the plant growth regulators (instead of autoclaving, R5.1), dipping process of the explant in IBA solution (R5.2); addition of AC to the culture media (R5.3); or a combination of both dipping in IBA and AC (R5.4).

There is no an evident explanation for the lack of effectiveness of these treatments that have proved to be valuable in inducing rhizogenesis in other species (reviewed in Thomas, 2008). Data point to a specific behavior of this genotype important to take into consideration in future research.

Shoots cultured in media R5.1 and R5.2 exhibited the same pattern as those cultivated in R5 throughout the experimental period; the percentage of rooting was low for 25 d of treatment (Table 3). From Day 30, a higher increase in rooting was observed in shoots growing in R5, R5.1, and R5.2, achieving similar values of those obtained in shoots cultured in media containing NAA and GA<sub>3</sub> (R1 and R1.1).

When the number of roots per rooted shoot was considered (Table 3), significant differences were observed among treatments. Shoots cultured in media with high NAA plus GA<sub>3</sub> (R1.2) or low NAA plus IBA and AC (R5.3) gave the highest number of roots per rooted shoot (6.69 and 7.10, respectively). However, the pattern was different over time (Table 3).

Table 2. Effect of culture medium on percentage of rooted shoots and number of roots per rooted shoot in Carrizo citrange shoots cultured in vitro.<sup>z</sup>

		Days						
		10	15	20	25	30	35	40
Rooted shoots (%)	R1	12.50 ± 1.5 b <sup>y</sup>	30.11 ± 1.2 c	41.67 ± 1.2 d	42.00 ± 1.5 d	43.90 ± 1.2 d	44.07 ± 1.0 d	45.45 ± 0.3 d
	R2	7.01 ± 1.0 b	10.50 ± 1.6 b	12.00 ± 2.4 b	12.71 ± 1.3 b	13.03 ± 1.2 b	14.33 ± 1.3 b	14.04 ± 1.1 b
	R3	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a
	R4	9.07 ± 2.0 b	12.30 ± 1.4 b	22.00 ± 1.8 c	24.82 ± 1.1 c	27.32 ± 1.5 c	28.56 ± 1.2 c	30.20 ± 1.3 c
	R5	8.98 ± 1.3 b	11.01 ± 1.2 b	22.50 ± 1.7 c	23.21 ± 1.2 c	39.87 ± 1.2 d	44.32 ± 1.7 d	53.20 ± 1.8 e
Number of roots/rooted shoot	R1	1.02 ± 0.7 b	1.05 ± 0.4 b	1.98 ± 0.7 b	2.06 ± 0.3 b	2.07 ± 0.4 b	2.08 ± 0.2 b	4.14 ± 0.3 c
	R2	1.20 ± 0.4 b	1.20 ± 0.2 b	1.25 ± 0.4 b	1.37 ± 0.3 b	1.43 ± 0.2 b	1.56 ± 0.5 b	1.54 ± 0.3 b
	R3	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a
	R4	1.73 ± 0.1 b	1.73 ± 0.1 b	1.73 ± 0.1 b	1.79 ± 0.1 b	1.86 ± 0.1 b	1.99 ± 0.0 b	2.13 ± 0.1 b
	R5	0.94 ± 0.2 b	0.98 ± 0.4 b	1.06 ± 0.7 b	2.06 ± 0.3 b	3.07 ± 0.4 c	5.08 ± 0.2 c	5.23 ± 0.3 d

<sup>z</sup>Shoots were grown in R1, R2, R3, R4, or R5 medium. Each point corresponds to the average of 48 replicates ± se.

<sup>y</sup>Data within each column, and for each parameter, followed by dissimilar letters differ significantly at  $P \leq 0.05$ .

Table 3. Effect of culture medium on percentage of rooted shoots and number of roots per rooted shoot in Carrizo citrange shoots cultured in vitro.<sup>z</sup>

		Days							
		10	15	20	25	30	35	40	
Rooted shoots (%)	R1	12.50 ± 1.5 b <sup>y</sup>	30.11 ± 1.2 c	41.67 ± 1.2 c	42.00 ± 1.5 c	43.90 ± 1.2 c	44.07 ± 1.0 c	45.45 ± 0.3 c	
	R1.1	11.48 ± 0.8 b	28.12 ± 1.3 c	45.45 ± 1.2 c	46.32 ± 0.9 c	48.00 ± 1.6 c	49.00 ± 1.6 c	55.32 ± 0.8 d	
	R1.2	13.93 ± 1.6 b	35.02 ± 0.6 c	49.25 ± 1.2 c	57.98 ± 0.6 d	58.77 ± 1.0 d	59.60 ± 1.0 d	68.18 ± 0.9 e	
	R5	8.98 ± 1.3 b	11.01 ± 1.2 b	22.50 ± 1.7 b	23.21 ± 1.2 b	39.87 ± 1.2 b	44.32 ± 1.7 c	53.20 ± 1.8 d	
	R5.1	9.86 ± 0.5 b	12.96 ± 1.0 b	23.30 ± 1.0 b	25.84 ± 1.3 b	30.27 ± 0.9 b	34.22 ± 0.8 b	39.50 ± 0.7 b	
	R5.2	11.95 ± 0.4 b	15.22 ± 1.6 b	20.50 ± 1.3 b	22.43 ± 0.9 b	32.98 ± 0.4 b	35.23 ± 0.4 b	38.90 ± 0.7 b	
	R5.3	1.71 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.21 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.20 ± 1.1 <sup>a</sup>	7.91 ± 1.0 <sup>a</sup>	10.90 ± 1.6 <sup>a</sup>	15.11 ± 0.5 <sup>a</sup>	19.13 ± 0.4 <sup>a</sup>	
	R5.4	1.00 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.21 ± 0.9 <sup>a</sup>	2.10 ± 1.5 <sup>a</sup>	5.23 ± 1.0 <sup>a</sup>	6.22 ± 1.0 <sup>a</sup>	8.38 ± 0.9 <sup>a</sup>	10.76 ± 0.4 <sup>a</sup>	
	Number of roots/rooted shoot	R1	1.02 ± 0.7 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.98 ± 0.7 <sup>b</sup>	2.06 ± 0.36 <sup>a</sup>	2.07 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.08 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.14 ± 0.3 <sup>a</sup>
		R1.1	1.50 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.30 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.60 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.70 ± 0.43 <sup>a</sup>	3.00 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.07 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.11 ± 0.3 <sup>a</sup>
R1.2		2.70 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.50 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.01 ± 0.5 <sup>c</sup>	4.30 ± 0.20 <sup>c</sup>	4.40 ± 0.2 <sup>c</sup>	5.67 ± 1.1 <sup>b</sup>	6.69 ± 1.4 <sup>c</sup>	
R5		0.94 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.06 ± 0.36 <sup>a</sup>	3.07 ± 0.4 <sup>b</sup>	5.08 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.23 ± 0.3 <sup>b</sup>	
R5.1		1.11 ± 0.7 <sup>a</sup>	1.56 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.05 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.32 ± 0.41 <sup>b</sup>	3.33 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.11 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.67 ± 0.3 <sup>a</sup>	
R5.2		0.50 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.32 <sup>a</sup>	2.10 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.50 ± 1.3 <sup>a</sup>	3.10 ± 0.2 <sup>a</sup>	
R5.3		3.00 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.00 ± 0.4 <sup>c</sup>	3.00 ± 0.5 <sup>c</sup>	3.60 ± 0.80 <sup>b</sup>	3.70 ± 0.4 <sup>c</sup>	3.70 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.90 ± 1.0 <sup>a</sup>	
R5.4		0.70 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.00 ± 0.1 <sup>c</sup>	6.00 ± 0.13 <sup>d</sup>	7.00 ± 0.2 <sup>d</sup>	7.00 ± 0.1 <sup>c</sup>	7.10 ± 1.2 <sup>c</sup>	

<sup>z</sup>Shoots were grown in R1, R1.1, R1.2, R5, R5.1, R5.2, R5.3, or R5.4 medium. Each point corresponds to the average of 48 replicates ± se.

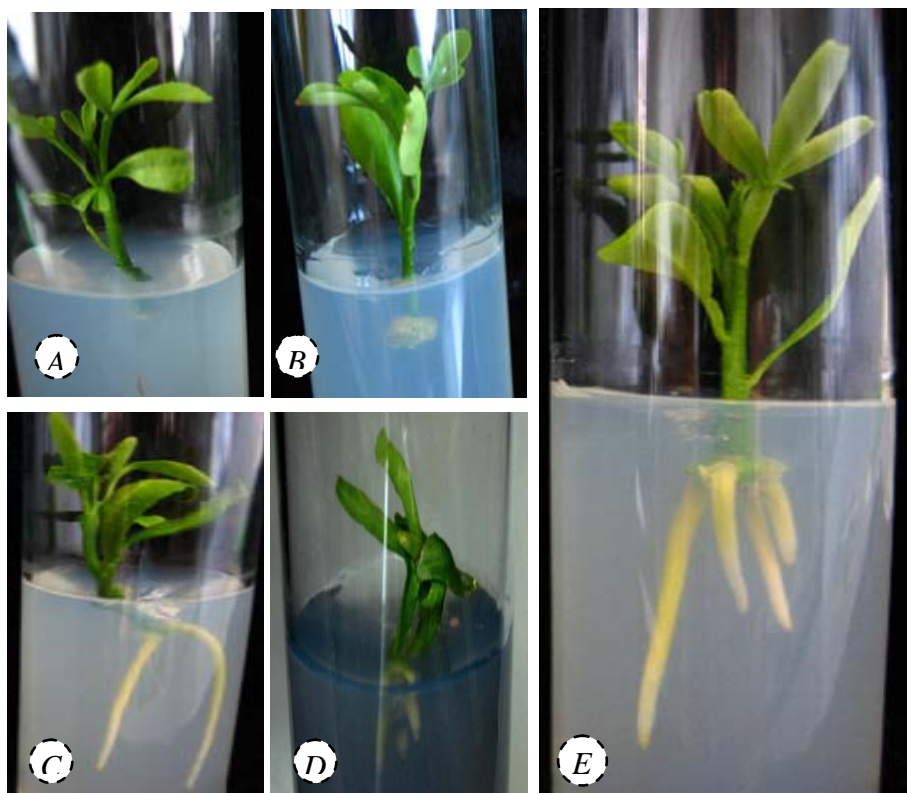
<sup>y</sup>Data within each column, and for each parameter, followed by dissimilar letters differ significantly at  $P \leq 0.05$ .

Different auxins at different concentrations provided diverse percentages of rooting when added to the culture medium. Best results, in terms of percentage of rooting, were obtained when 10.8 μM NAA and 0.3 μM GA<sub>3</sub> were added to the culture medium. AC had a negative effect on the percentage of rooted shoots when incorporated into the culture medium; however, it had a positive effect when the number of roots per rooted shoot was considered. Because of the highest percentages of rooting together with a high number of roots per rooted shoot were obtained when R1.2 was used as rooting media, we conclude that a combination of 10.8 μM NAA and 0.3 μM GA<sub>3</sub> in the culture medium is the best option for the development of in vitro adventitious roots in CC shoots.

#### Literature Cited

- Al-Bahrany, A.M. 2002. Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantiifolia* (Christm.). *Swing. Sci. Hort.* 95:285–295.
- Arena, M.E., G. Martinez-Pastur, M.P. Benavides, and N. Curvetto. 2005. Polyamines and inhibitors used in successive culture media for in vitro rooting in *Berberis buxifolia*. *N.Z. J. Bot.* 43:373–380.
- Baksha, R., R. Alam, M.Z. Karim, S.A. Mannan, B.P. Podder, and A.B.M.M. Rahman. 2003. Effect of auxin, sucrose and pH level on in vitro rooting of callus induced micro shoots of sugarcane (*Saccharum officinarum*). *J. Biol. Sci.* 3:915–920.
- Bordón, Y., J.L. Guardiola, and L. García. 2000. Genotype affects the morphogenic response in vitro of epicotyl segments of citrus rootstocks. *Ann. Bot. (Lond.)* 86:159–166.
- Carimi, F. 2001. Somatic embryogenesis and organogenesis in citrus for sanitation and in vitro conservation, p. 115–128. In: D'Onghia, A.M., U. Menini, and G.P. Martelli (eds.). *Improvement of the citrus sector by the setting up of the common conservation strategies for the free exchange of healthy citrus genetic resources*. CIHEAM-IAMB, Bari.
- Castellanos, M., B. Power, and M. Davey. 2008. Tissue culture technologies for micropropagation, in vitro regeneration and genetic improvement of poinsettia. *Prop Orn. Plants* 8: 173–185.
- Chakravarty, B. and B.C. Goswami. 1999. Plantlet regeneration from long-term callus cultures of *Citrus acida* Roxb. and the uniformity of regenerated plants. *Sci. Hort.* 82:159–169.
- Debergh, P. and R.H. Zimmerman. 1991. *Micropropagation: Technology and application*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Dewan, A., K. Nanda, and S.C. Gupta. 1992. In vitro micropropagation of *Acacia nilotica* subsp. *indica* Brenan via cotyledonary nodes. *Plant Cell Rep.* 12:18–21.
- Fotso, A., N.D. Tchinda, M. Duclair, and D.O. Ndoumou. 2004. Propagation de *Ricinodendron heudelotii* par bouturage in vitro. *Fruits* 10:351–358.
- George, E.F., M.A. Hall, and G.J. De Klerk. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd Ed., Vol. 1 The background. Springer Verlag, Dordrecht, The Netherlands.
- Hassanein, A.M. and M.M. Azooz. 2003. Propagation of *Citrus reticulata* via in vitro seed germination and shoot cuttings. *Biol. Plant.* 47:173–177.
- Montoliu, A., M.F. López-Climent, V. Arbona, R.M. Pérez-Clemente, and A. Gómez-Cadenas. 2009. A novel in vitro tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. *Plant Growth Regulat.* 59:179–187.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Nehra, N.S., M.R. Becwar, W.H. Rottmann, L. Pearson, K. Chowdhury, S. Chang, H.D. Wilde, R.J. Kodrzycki, C. Zhang, K.C. Gause, D.W. Parks, and M.A. Hinchee. 2005. Forest biotechnology: Innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41:701–717.
- Pereira, A.M.S., J.R. Moro, R.M.M. Cerdeira, and S.C. Franca. 1995. Effects of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 42:295–297.
- Pérez-Tornero, O., C.I. Tallón, and I. Porras. 2010. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 100:263–271.
- Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol. Adv.* 26:618–631.

AU1



**Figure 8.1.** Figure showing *in vitro* cultured shoots of citrange Carrizo. (A) Shoot 4 days after subculture on rooting medium. (B) Shoot 40 days after subculture on R3 medium. No roots were developed. (C) Rooted shoots 40 days after subculture on R4 medium. (D) Rooted shoots 40 days after subculture on R5.3 medium. (E) Rooted shoots 40 days after subculture on R1.2 medium.

